

Aus dem Biomedizinischen Zentrum
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Christian Haass

Familiäre Alzheimer Mutationen: Untersuchung molekularer Pathomechanismen und deren pharmakologische Modulation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Johannes Trambauer
aus Aachen

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Harald Steiner

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Christof Haffner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

»Familiäre Alzheimer Mutationen: Untersuchung molekularer Pathomechanismen und deren pharmakologische Modulation«

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 03.03.2020

Johannes Trambauer

»Erstzunehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei
Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.«

Thorstein Veblen

»Nur wer erwachsen wird und Kind bleibt, ist ein Mensch!«

Erich Kästner

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
PUBLIKATIONEN DER DISSERTATION	3
ZUSAMMENFASSUNG	4
SUMMARY	6
1 EINLEITUNG	8
1.1 DIE ALZHEIMER-ERKRANKUNG	8
1.2 DAS AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN APP	11
1.3 DIE PRÄSENILINE UND DER INTRAMEMBRANPROTEASEKOMPLEX γ -SEKRETASE	16
1.4 AUSWIRKUNGEN DER FAD-MUTATIONEN	27
1.5 DIE AMYLOID-HYPOTHESE	31
1.6 PHARMAKOLOGISCHE STRATEGIEN GEGEN DIE ALZHEIMER-ERKRANKUNG	35
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	43
2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
2.1 PUBLIKATION I: »Amyloid-PET predicts inhibition of <i>de novo</i> plaque formation upon chronic γ -secretase modulator treatment«	44
2.2 PUBLIKATION II: »Generation and deposition of $A\beta_{43}$ by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer's disease«	46
2.3 PUBLIKATION III: » $A\beta_{43}$ -producing PS1 FAD mutants cause altered substrate interactions and respond to γ -secretase modulation«	48
2.4 DISKUSSION	50
3 MATERIAL UND METHODEN	57
3.1 ANTIKÖRPER	57
3.2 ZELLINIEN	58
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	59
3.4 PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	61
3.5 ZELLKULTURMETHODEN	63
3.6 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	65
LITERATUR	74
DANKSAGUNG	94

Abkürzungsverzeichnis

AcD	Azidische Domäne von APP (engl. <i>acidic domain</i>)
ADAM	engl. <i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
AH	<i>Amyloid-Hypothese</i>
AICD/AICDs	Intrazelluläre Domäne/n von APP (engl. <i>APP intracellular domain</i>)
APH-1	<i>Anterior Pharynx-defective 1</i>
API	engl. <i>Alzheimer's Prevention Initiative</i>
ApoE	<i>Apolipoprotein E</i>
APP	Amyloidvorläuferprotein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
APPsw	APP mit der »schwedischen« KM670/671NL Mutation
AS	<i>Aminosäure</i>
A β	<i>Amyloid-β</i>
Bp	<i>Basenpaare</i>
Bpa	<i>p-Benzoyl-L-Phenylalanin</i>
C83	Durch die α -Sekretase erzeugtes C-terminales APP-Fragment, vgl. CTF α
C99	Rekombinant hergestelltes APP-C100-His ₆ , ein auf dem APP-CTF β basierendes γ -Sekretasesubstrat mit N-terminalem Methionin
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
CSF	Gehirnliquor (engl. <i>cerebrospinal fluid</i>)
CTF/CTFs	<i>Carboxy-terminales Fragment/e</i>
CTF α	Durch die α -Sekretase erzeugtes C-terminales APP-Fragment
CTF β	Durch BACE1 erzeugtes C-terminales APP-Fragment
CTF β'	Durch BACE1 an einer alternativen Spaltstelle (Y10/E11) erzeugtes C-terminales APP-Fragment
DIAN	engl. <i>Dominantly Inherited Alzheimer Network</i>
DMEM	<i>Dulbecos Modified Eagle Medium</i>
ECL-IA	<i>Elektrochemilumineszenz-Immunoassay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
FAD	Vererbte Form der Alzheimer-Erkrankung (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FL	Ungeschnittene, vollständige Form eines Proteins (engl. <i>full length</i>)
GSI/GSIs	γ -Sekretaseinhibitor/en
GSM/GSMs	γ -Sekretasemodulator/en
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen 293 (engl. <i>human embryonal kidney cells 293</i>)
HEK293sw	APPsw überexprimierende HEK293-Zellen
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IB	<i>Immunblot</i>
ICD/ICDs	Intrazelluläre Domäne/n (engl. <i>intracellular domain</i>)
IMP/IMPs	<i>Intramembranprotease/n</i>
IP	<i>Immunpräzipitation</i>
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen (engl. <i>induced pluripotent stem cells</i>)

KI	<u>K</u> nock- <u>i</u> n
KO	<u>K</u> nock- <u>o</u> t
LOAD	Alzheimer-Erkrankung mit spätem Eintrittsalter (engl. <i>late onset <u>A</u>lzheimer's <u>d</u>isease</i>)
MEF	<u>M</u> urine <u>e</u> mbryonale <u>F</u> ibroblasten
NCT	<u>N</u> icastrin
NICD	Intrazelluläre Domäne von Notch-1 (engl. <i><u>N</u>otch-1 <u>i</u>ntra<u>c</u>ellular <u>d</u>omain</i>)
NSAID	Nichtsteroidales Antirheumatikum (engl. <i><u>n</u>on-<u>s</u>teroidal <u>a</u>nti-<u>i</u>nflammatory <u>d</u>rug</i>)
NTF	Amino-terminales Fragment
PAS	<u>P</u> rotein <u>A</u> - <u>S</u> epharose
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i><u>p</u>olymerase-<u>c</u>hain-<u>r</u>eaction</i>)
PEN-2	<u>P</u> resenilin <u>e</u> nhancer <u>2</u>
PET	<u>P</u> ositronen- <u>E</u> missions- <u>T</u> omographie
PGS	<u>P</u> rotein <u>G</u> - <u>S</u> epharose
PH	<u>P</u> räsenilin- <u>H</u> ypothese
PI	Proteaseinhibitor
PS1	<u>P</u> räsenilin- <u>1</u>
PS2	<u>P</u> räsenilin- <u>2</u>
PVDF	<u>P</u> olyvinyli <u>d</u> enfluorid
RIP	<u>R</u> egulierte <u>I</u> ntramembran <u>p</u> roteolyse
RIPA	<u>R</u> adioimmu <u>n</u> prezipitations- <u>A</u> ssaypuffer
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
sAD	Sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung (engl. <i>sporadic <u>A</u>lzheimer's <u>d</u>isease</i>)
sAPP	<u>S</u> ekretiertes N-terminales <u>A</u> PP(-Fragment)
sAPP α	Durch die α -Sekretase abgespaltenes sekretiertes <u>A</u> PP α
sAPP β	Durch die β -Sekretase abgespaltenes sekretiertes <u>A</u> PP β
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<u>S</u> DS- <u>P</u> olyacrylamid <u>g</u> ele <u>e</u> ktrophorese
T _m	Schmelztemperatur
TMD/TMDs	<u>T</u> rans <u>m</u> embran <u>d</u> omäne/n
WT	<u>W</u> ild <u>t</u> yp

Publikationen der Dissertation

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht. Nachdrucke der Publikationen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

I. Amyloid-PET predicts inhibition of *de novo* plaque formation upon chronic γ -secretase modulator treatment

Brendel M*, Jaworska A*, Herms J*, **Trambauer J***, Rötzer C, Gildehaus FJ, Carlsen J, Cumming P, Bylund J, Luebbers T, Bartenstein P, Steiner H, Haass C, Baumann K, Rominger A. (*geteilte Erstautorenschaft)

Mol Psychiatry. 2015 Jun 9. doi: 10.1038/mp.2015.74

II. Generation and deposition of A β 43 by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer's disease

Kretner B*, **Trambauer J***, Fukumori A, Mielke J, Kuhn PH, Kremmer E, Giese A, Lichtenthaler SF, Haass C, Arzberger T, Steiner H. (*geteilte Erstautorenschaft)

EMBO Mol Med. 2016 Mar 17. doi: 10.15252/emmm.201505952

III. A β 43-producing PS1 FAD mutants cause altered substrate interactions and respond to γ -secretase modulation

Trambauer J, Rodríguez Sarmiento RM, Fukumori A, Feederle R, Baumann K, Steiner H

EMBO Rep. 2020 Jan 7. doi: 10.15252/embr.201947996

Vor kurzem wurde zusätzlich ein Übersichtsartikel publiziert, in dem die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit weiteren Entwicklungen im Feld diskutiert wurden:

Pathogenic A β generation in familial Alzheimer's disease: novel mechanistic insights and therapeutic implications

Trambauer J, Fukumori A, Steiner H

Curr Opin Neurobiol. 2020 Apr 1. doi: 10.1016/j.conb.2020.01.011

Zusätzlich wurden einige der hier verwendeten Methoden und weitere Protokolle zur Analyse der Bindung von γ -Sekretasemodulatoren und ihrer Auswirkungen auf die A β -Profile im Rahmen einer Methodensammlung veröffentlicht:

Analyzing Amyloid- β Peptide Modulation Profiles and Binding Sites of γ -Secretase Modulators

Trambauer J, Fukumori A, Kretner B, Steiner H

Methods Enzymol. 2017. doi: 10.1016/bs.mie.2016.10.013

Zusammenfassung

Die Alzheimer-Erkrankung ist die häufigste Ursache von Demenz und damit eine große Herausforderung für die gesamte Gesellschaft. Da bislang wirksame Medikamente fehlen, steht die Wissenschaft unter großem Druck mögliche Zielmoleküle für neue Therapieoptionen zu identifizieren. Um genauere Einblicke in den Entstehungsprozess der Krankheit zu gewinnen, werden besonders mit der familiären Form der Krankheit (FAD, engl. *familial Alzheimer's disease*) verknüpfte Mutationen untersucht. Die meisten dieser Mutationen betreffen Präsenilin-1 (PS1) und sein Homolog Präsenilin-2, die als katalytischer Teil des γ -Sekretasekomplexes für die Spaltung eines C-terminalen Fragmentes (CTF β) des Amyloidvorläuferproteins (APP, engl. *amyloid precursor protein*) in verschiedene Amyloid- β -(A β -)Peptide verantwortlich sind. Da das bei FAD verstärkt produzierte, längere A β_{42} als primärer Auslöser der Krankheit angesehen wird, ist ein genaues Verständnis der Produktion längerer A β -Spezies von entscheidender Bedeutung, um gegen A β gerichtete Wirkstoffe zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezielle PS1-FAD-Mutationen, wie V261F und L435F, untersucht, die eine stark verringerte Gesamtaktivität und eine beeinträchtigte PS1-Endoproteolyse zur Folge haben. Da sie aber trotz der geringen A β -Produktion die Alzheimer-Erkrankung verursachen, stellte sich die Frage, ob wirklich eine veränderte A β -Produktion oder eher die Inhibition der Prozessierung anderer γ -Sekretasesubstrate der Auslöser der Krankheit ist. In Zellkulturexperimenten und durch Färbungen von Hirnschnitten von Patienten konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten vermehrt toxisches A β_{43} produzieren und so ein stark erhöhtes A β_{42+43} /A β_{40} -Verhältnis verursachen. Damit erklärt die bisher übersehene, verstärkte Produktion von A β_{43} die Pathogenität der hier untersuchten PS1-Mutanten. Die Produktion längerer A β -Spezies durch die FAD-Mutanten wird auf eine verringerte Stabilität des Präsenilin-A β_n -Komplexes und eine damit einhergehende verstärkte Dissoziation der längeren A β -Spezies zurückgeführt. Die Ursache dieser Destabilisierung ist jedoch noch nicht bekannt. Um dies genauer zu beleuchten, wurden verschiedene A β_{43} produzierende PS1-Mutanten genauer untersucht, darunter sowohl Mutanten mit normaler als auch mit verringerter Gesamtaktivität. Dabei veränderten alle untersuchten Mutanten die Interaktion zwischen der γ -Sekretase und dem Substrat CTF β im Bereich um die Schnittstellen der γ -Sekretase. Diese Fehlpositionierung des Substrats deutet auf eine veränderte Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes hin, die letztlich zu dessen verringerter Stabilität führen könnte.

Da die längeren A β -Spezies allgemein als Auslöser der Alzheimer-Erkrankung angesehen werden, ist die Reduktion von A β die vorherrschende Behandlungsstrategie, etwa durch Aktivierung des A β -Abbaus durch Immunisierung mit anti-A β -Antikörpern oder durch Inhibition der A β produzierenden β - und γ -Sekretase. Dabei treten jedoch, vor allem im Fall der

γ -Sekretaseinhibitoren, starke Nebenwirkungen auf. Eine mögliche Alternative stellen γ -Sekretasemodulatoren (GSMs) dar, da sie die γ -Sekretase nicht inhibieren, sondern die Produktion der verschiedenen A β -Spezies in Richtung der kürzeren Formen verschieben, und so weniger Nebenwirkungen verursachen sollten.

Anders als zwei zuvor beschriebene GSMs, reduzierte der hier vorgestellte neue GSM RO7019009 die A β_{43} -Produktion der untersuchten Mutanten deutlich. Selbiges galt auch für A β_{42} , wobei einige Mutationen erst bei deutlich höheren Konzentrationen des Modulators reagierten. Wie erwartet, wurden im Gegenzug vermehrt kürzere A β_{37} - und A β_{38} -Peptide gebildet. Hierbei zeigten sich, wie schon bei der A β_{42} -Reduktion, mutantenspezifische Unterschiede. Manche Mutanten (z.B. V261F und L435F) sekretierten beide kurze Spezies, während andere nur die A β_{38} -Produktion erhöhten. Die Produktion der unterschiedlichen A β -Spezies in den beiden A β -Produktlinien wurde bei verschiedenen PS1-Mutationen also individuell moduliert. Um die Wirksamkeit von GSMs nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zu untersuchen, wurden Mäuse, welche die »schwedische« APP-FAD-Mutation exprimieren, über einen Zeitraum von 6 Monaten mit dem GSM RO5506284 behandelt und longitudinal mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) untersucht. Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Gehirne der Tiere zusätzlich biochemisch und immunhistochemisch untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass der GSM den Anstieg der Amyloidsignale, also das Fortschreiten der A β -Pathologie, im Gehirn verringern und die Mengen an abgelagertem A β_{42} reduzieren konnte. Tiere, die zu Beginn der Behandlung schon viel A β -Pathologie aufwiesen, reagierten weniger stark auf die Modulation als Tiere mit niedrigen Ausgangswerten, die besser auf die Behandlung ansprachen. Die gesamte Plaquesfläche ließ sich durch die Behandlung reduzieren, dabei wurde vor allem die Bildung neuer, kleiner Plaques verhindert, während sich das verbliebene A β immer noch an bereits vorhandene Plaques anlagern konnte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung eines frühen Beginns der Behandlung, möglichst vor oder zu Beginn der A β -Pathologie.

In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass nahezu inaktive PS1-FAD-Mutanten erhöhte Mengen A β_{43} produzieren und so trotz sehr geringer A β -Sekretion die Krankheit in Einklang mit der Amyloid-Hypothese auslösen können. Eine der Ursachen für die erhöhte Produktion längerer A β -Spezies bei diesen und anderen A β_{43} -produzierenden Mutanten könnte die, durch die Mutationen induzierte, Fehlpositionierung des Substrats sein. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass neuere GSMs *in vitro* und *in vivo* die Mengen längerer A β -Spezies, auch bei PS1-FAD-Mutanten, verringern können und sie daher eine mögliche Therapieoption darstellen.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and thus causes enormous problems for patients and society. Since no disease-modifying therapy is available so far, there is need for the development of new, effective and affordable drugs. In order to achieve this, the pathogenesis of AD has to be elucidated in more detail. As familial Alzheimer's disease (FAD) linked mutations in presenilin-1 (PS1) are the main cause of early onset AD, they are an important tool to understand the detailed pathomechanism. PS1 and its homolog presenilin-2 form the catalytic subunit of the intramembraneprotease complex γ -secretase, which catalyses the final steps of amyloid precursor protein (APP) processing. γ -Secretase cleaves the APP C-terminal fragment (CTF β) into different amyloid- β (A β) species. FAD mutations in PS1 increase the production of longer A β_{42} , which is thought to be the main trigger of the disease. Therefore, a better understanding of the molecular consequences of these mutants could help to develop new drugs.

In this study, a special type of PS1 FAD mutants (e.g. V261F, L435F) was investigated. These mutants have a strongly reduced total activity and show impaired endoproteolysis. Although the total A β levels produced by these mutants are very low, they still cause the disease. This led to the hypothesis that inhibited processing of other γ -secretase substrates, not increased levels of longer A β species, is the relevant disease trigger. However, it could be shown that these mutants produce high relative amounts of the neurotoxic and aggregation prone A β_{43} . Consistently, brain sections of PS1 L435F mutation carriers presented a drastically increased A β_{43} staining compared to controls. This previously overlooked A β_{43} production leads to increased A β_{42+43} /A β_{40} ratios that could cause AD in line with the amyloid hypothesis. These findings contradict the hypothesis of decreased processing of other γ -secretase substrates as disease trigger and support the idea that lowering the levels of long A β species is a good approach for successful treatment strategies.

In general, the increased production of longer A β species by FAD mutants is explained by a decreased stability of the presenilin-A β_n complex, which causes the dissociation of the longer A β species before they can be cleaved further. However, the cause of this destabilization remains unknown. By analysing two different sets of A β_{43} -producing PS1 FAD mutants, including both normally endoproteolysed and virtually inactive mutants, it could be shown that all these mutants change the binding of the A β precursor CTF β to the active site of the protease. This mispositioning of the substrate indicates a changed conformation of the substrate-enzyme complex, which can be a possible explanation for the decreased complex stability in FAD mutants.

As A β is widely accepted as primary disease trigger, current therapeutic approaches try to lower

A β levels either by activation of the A β clearance through immunization or by inhibition of the A β -producing β - and γ -secretases. The latter approach faces the problem that inhibition γ -secretase led to severe side effects in clinical trials. γ -Secretase modulators (GSMs) are small molecules that shift the A β production towards shorter peptides, thereby reducing the amount of toxic A $\beta_{42/43}$. However, they do not alter the total γ -secretase activity. The new GSM RO7019009, which was tested in this study, efficiently reduced A β_{43} production for all investigated mutants. A β_{42} production was reduced in these mutants as well, although some of them only responded at higher GSM concentrations. Consequently, the production of A β_{38} was increased upon RO7019009 treatment for all the mutants, while only some mutants (e.g. V261F, L435F) increased the production of both short species A β_{37} and A β_{38} . These findings indicate that RO7019009 acts differently on both A β product lines depending on the individual PS1 mutant. In an additional part of the study, GSM function was assessed *in vivo*. Transgenic mice, expressing the »swedish« APP FAD mutant, were treated for 6 months with the GSM RO5506284. During the experiment, amyloid levels were monitored longitudinally by positron emission tomography (PET). After the treatment, the mouse brains were analysed biochemically and immunohistochemically in order to be compared with the PET-measurements. The amyloid levels measured by PET increased significantly slower in the treated animals compared to the control group. RO5506284 treatment reduced the amount of deposited A β_{42} in the brain. In addition, the amyloid plaque area was smaller in GSM-treated animals, which showed lesser smaller plaques and more large ones. This indicates that the reduction of A β by the GSM was strong enough to inhibit plaque formation; however, the remaining A β still was able to attach to already formed plaques. Interestingly, amyloid levels at the beginning of the treatment predicted its efficiency. Animals with high initial amyloid levels were less reactive towards the GSM, while animals with low starting amyloid levels responded well. These results underline the importance of an early treatment since GSM treatments seem to be more effective when there is no or only little plaque pathology present.

Taken together, this thesis shows that virtually inactive PS1 FAD mutations secrete high relative amounts of the neurotoxic A β_{43} , which could be responsible for the pathogenicity of these mutations. These and other A β_{43} -producing mutations cause a mispositioning of the substrate that could contribute to the increased production of longer A β species by FAD mutants. In addition, the investigated GSMs were able to decrease these longer A β species *in vitro* and *in vivo* and could therefore be a promising therapeutic approach for AD.

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung ist für etwa 60-80 % aller Demenzen verantwortlich und damit, vor anderen Formen wie vaskulärer oder frontotemporaler Demenz, deren häufigste Ursache (Barker *et al.* 2002, Alzheimer's Association 2018). Der normale Krankheitsverlauf führt erst zu fortschreitendem Gedächtnisverlust und im späteren Verlauf zum Verlust weiterer kognitiver Funktionen. Dies führt dazu, dass Patienten ihren Alltag nicht mehr selbstständig bestreiten können und auf qualifizierte Hilfe angewiesen sind (Winblad *et al.* 2016). Die Wahrscheinlichkeit an Demenz zu erkranken nimmt mit steigendem Alter massiv zu. Sind in Europa nur 1,6 % der Sechzigjährigen erkrankt, so steigt das Risiko bei Menschen über 90 Jahren auf etwa 40 % an (Alzheimer Europe 2013a). Weltweit leiden etwa 40-50 Millionen Menschen an Demenz, davon ca. 1,5 Millionen in Deutschland (Alzheimer Europe 2013b, GBD 2016 Dementia Collaborators 2019). Laut Weltgesundheitsorganisation sind Demenzerkrankungen damit die weltweit fünfthäufigste Todesursache (WHO 2016). Berechnungen gehen davon aus, dass sich die Anzahl der Patienten etwa alle 20 Jahre verdoppelt und so im Jahr 2050 bis zu 135 Millionen Menschen erkrankt sein könnten (Prince *et al.* 2015). Da Demenzpatienten eine intensive Pflege benötigen, stellen diese Prognosen die Gesellschaft vor eine immense finanzielle Herausforderung und erhöhen den Druck auf die Forschung wirksame und effiziente Medikamente zu entwickeln (Winblad *et al.* 2016).

Die Alzheimer-Erkrankung ist nach Alois Alzheimer benannt, der erstmals 1906 von diesem Krankheitsbild berichtete (Alzheimer 1907 , Alzheimer 1911). Das Gehirn seiner Patientin Auguste Deter zeigte erhebliche Neurodegeneration (Hirnatrophie), extrazelluläre Ablagerungen, sogenannte Amyloidplaques (Abb. 1A), sowie neurofibrilläre Bündel (Abb. 1B) innerhalb der Neuronen. Amyloidplaques und neurofibrilläre Bündel sind bis heute die wichtigsten pathologischen Merkmale der Krankheit und notwendig für ihre eindeutige Diagnose (Hyman *et al.* 2012). Der mit dem Neuronenverlust verbundene graduelle Verlust an

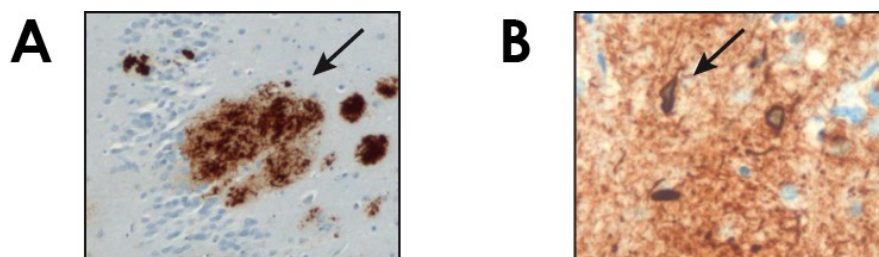


Abbildung 1: Neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung

A: Extrazelluläre Amyloidplaques, die vor allem aus längeren, $A\beta$ -Spezies bestehen ($A\beta_{43}$ -Färbung).
B: Intrazelluläre neurofibrilläre Bündel aus hyperphosphoryliertem Tau (phospho-Tau-Färbung).

Synapsen korreliert gut mit dem klinischen Verlauf der Krankheit (DeKosky & Scheff 1990). Die Menge der neurofibrillären Bündel kann man dabei besser mit dem Verlust kognitiver Funktionen verknüpfen als die Anzahl der Amyloidplaques (Nelson *et al.* 2012). Die neurofibrillären Bündel befinden sich zudem verstärkt in den Regionen, in denen Neuronen absterben. Ausmaß und Lokalisierung der neurofibrillären Bündel werden daher zur Klassifizierung der verschiedenen Krankheitsstadien herangezogen (Braak & Braak 1991, Nelson *et al.* 2012). Neurofibrilläre Bündel bestehen aus aggregiertem, hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Grundke-Iqbal *et al.* 1986, Kosik *et al.* 1986, Goedert *et al.* 1988, Wischik *et al.* 1988a, Wischik *et al.* 1988b, Kopke *et al.* 1993). Tau bindet Mikrotubuli, stabilisiert diese damit, reguliert zusätzlich ihren Auf- und Abbau und beeinflusst dadurch den axonalen Transport (Wang & Mandelkow 2016). Im Krankheitsverlauf wird es hyperphosphoryliert, aggregiert und formt die intrazellulären Bündel (Kopke *et al.* 1993, Wang & Mandelkow 2016). Tau-Aggregate kommen neben der Alzheimer-Erkrankung auch bei anderen Erkrankungen vor, den sogenannten Tauopathien, so z.B. bei progressiver supranukleärer Blickparese (Lee *et al.* 2001b).

Die parenchymalen Amyloidplaques der Alzheimer-Patienten bestehen aus fibrillären Amyloid- β ($A\beta$)-Peptiden und sind charakteristisch für die Krankheit (Glenner & Wong 1984, Masters *et al.* 1985). Die $A\beta$ -Peptide haben eine Länge von 37-43 Aminosäuren und entstehen durch die Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins (APP, engl. *amyloid precursor protein*) (Estus *et al.* 1992, Golde *et al.* 1992, Haass *et al.* 2012). Die Amyloidplaques der Alzheimer-Erkrankung enthalten vor allem das 42 Aminosäuren lange $A\beta_{42}$ bzw. das längere $A\beta_{43}$ (Iwatsubo *et al.* 1994). Neben der Alzheimer-Erkrankung kommen $A\beta$ -Ablagerungen auch bei zerebraler Amyloidangiopathie vor. Hierbei befinden sich die Ablagerungen allerdings in den Gefäßwänden des Gehirns und bestehen eher aus kürzeren $A\beta$ -Spezies, wie $A\beta_{40}$ (Thal *et al.* 2008, Reinert *et al.* 2014).

1.1.1 Genetische Ursachen der Alzheimer-Erkrankung

Dem Großteil aller Alzheimer-Erkrankungen liegen keine bekannten genetischen Ursachen zu Grunde, man spricht daher von sporadischen Krankheitsfällen (sAD, engl. *sporadic Alzheimer's disease*, bzw. LOAD, engl. *late onset Alzheimer's disease*). sAD betrifft in der Regel ältere Patienten über 60 Jahren. Die familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung (FAD, engl. *familial Alzheimer's disease*) hingegen, tritt bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre) auf und ist für weniger als 1 % der Fälle verantwortlich (Holtzman *et al.* 2011). Sie wird autosomal-dominant durch Mutationen in den Genen für die drei Proteine APP (Chartier-Harlin *et al.* 1991, Goate *et al.* 1991, Murrell *et al.* 1991), Präsenilin-1 (PS1, (Sherrington *et al.* 1995)) und Präsenilin-2 (PS2, (Levy-Lahad *et al.* 1995, Rogaev *et al.* 1995)) vererbt. Derzeit sind 28 Mutationen im APP, 224 Mutationen im PS1 sowie 9

Mutationen im PS2 bekannt, die jeweils zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führen (Alzforum Mutations Database). Zusätzlich sind Duplikationen des APP-Genlokus bekannt, die ebenfalls die Alzheimer-Erkrankung auslösen (TCW & Goate 2017).

Daneben gibt es einige Gene (Risikofaktoren), welche die Wahrscheinlichkeit zu erkranken erhöhen, wenn sie bestimmte Mutationen aufweisen. Der Hauptrisikofaktor ist das Apolipoprotein E (ApoE) (Holtzman *et al.* 2011, Liu *et al.* 2013). ApoE kommt beim Menschen in drei verschiedenen Allelen, ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, vor, wobei ApoE $\epsilon 3$ die verbreitetste Form ist. Ein vorhandenes $\epsilon 4$ -Allel erhöht die Wahrscheinlichkeit zu erkranken um das Dreifache, zwei $\epsilon 4$ -Allele sogar um das Zwölfwache, während vorhandene ApoE $\epsilon 2$ -Allele das Krankheitsrisiko reduzieren (Corder *et al.* 1993, Strittmatter *et al.* 1993, Verghese *et al.* 2011, Reiman *et al.* 2020). Zusätzlich wurde kürzlich bei einer FAD-Patientin eine protektive ApoE $\epsilon 3$ -Mutation identifiziert (Arboleda-Velasquez *et al.* 2019), die zu einem deutlich späteren Ausbruch der Krankheit führt. Der genaue Wirkmechanismus der verschiedenen ApoE-Formen ist noch unklar. Studien zeigen allerdings, dass sie den A β -Abbau und dessen Aggregation unterschiedlich beeinflussen, wobei $\epsilon 2$ und $\epsilon 4$ entgegengesetzt wirken (Kim *et al.* 2009, Castellano *et al.* 2011, Verghese *et al.* 2011, Hashimoto *et al.* 2012). Neben ApoE sind zusätzlich noch weitere Risikofaktoren, wie CLU und ABCA7, mit dem A β -Abbau verknüpft (Karch & Goate 2015).

Da genomische Assoziationsstudien neben ApoE noch weitere Risikofaktoren (z.B. TREM2, CLU, CR1, CD33) (Villegas-Llerena *et al.* 2016) identifiziert haben, welche besonders in den Mikroglia, den Immunzellen des Gehirns, wichtig sind, ist die Rolle des angeborenen Immunsystems in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Alzheimer-assoziierte Mutationen in einigen dieser Risikogene, wie z.B. TREM2 und ApoE, hemmen den Abbau von fibrillärem A β durch Mikroglia (Villegas-Llerena *et al.* 2016, Yeh *et al.* 2016, Gratuze *et al.* 2018). Deren genaue Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung ist allerdings noch unklar. Neuen Studien zufolge wird die Antwort der Mikroglia bei Stimulation, z.B. durch A β -Peptide, so verändert, dass sie nicht mehr adäquat auf die pathogenen Veränderungen im Gehirn reagieren können. Dadurch können sie die Entstehung der Krankheit nicht verhindern und fördern diese eventuell sogar (Jay *et al.* 2017, Keren-Shaul *et al.* 2017, Krasemann *et al.* 2017, Gratuze *et al.* 2018, Henstridge *et al.* 2019).

Sowohl die Risikofaktoren als auch die drei Proteine, in denen Mutationen die Alzheimer-Erkrankung auslösen können sind mit dem Auf- bzw. Abbau von A β verknüpft. Eine veränderte A β -Homöostase scheint also eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Krankheit zu spielen, weswegen die Prozessierung von APP zu A β durch Präsenilin und andere Proteasen sowie die beteiligten Proteine im Folgenden genauer betrachtet werden.

1.2 Das Amyloidvorläuferprotein APP

APP (Abb. 2) wurde vor etwa 30 Jahren kloniert und ist ein Typ-I-Membranprotein mit einer Transmembrandomäne (TMD), einer kurzen, cytosolischen, intrazellulären Domäne (AICD, engl. *APP intracellular domain*) sowie einer großen glykosylierten extrazellulären/luminalen Ektodomäne (Goldgaber *et al.* 1987, Kang *et al.* 1987, Robakis *et al.* 1987, Tanzi *et al.* 1987, Dyrks *et al.* 1988). Die Ektodomäne enthält zwei unabhängig voneinander gefaltete Domänen, die Cysteinreiche E1- und die helikale E2-Domäne. Beide sind durch eine azidische Domäne (AcD) verbunden und enthalten Heparin- und Metallbindestellen (Kupfer und Zink), welche vermutlich wichtig für die Homodimerisierung der APP-Ektodomänen sind (Bush *et al.* 1993, Multhaup *et al.* 1996, Hoefgen *et al.* 2014). Die A β -Domäne (Abb. 2) umspannt die N-terminale Grenze der TMD und enthält ein GxxxG-Motiv, welches für die Homodimerisierung von APP TMDs sowie die Bindung von Cholesterin an APP notwendig ist (Munter *et al.* 2007, Barrett *et al.* 2012). Die AICD enthält mehrere Phosphorylierungsstellen sowie ein YENPTY-Motiv als Internalisierungssignal (Lai *et al.* 1995, Marquez-Sterling *et al.* 1997, Schettini *et al.* 2010). Es sind drei APP-Isoformen bekannt: APP₇₇₀, APP₇₅₁ und APP₆₉₅ (Abb. 2) (Müller *et al.* 2017). Sie unterscheiden sich darin, ob sie zusätzlich eine Kunitz-like-Proteaseinhibitor-(KPI-) und Ox-2-Antigendomäne enthalten. APP₇₇₀ beinhaltet sowohl die KPI- als auch die Ox-2-Domäne. Bei APP₇₅₁ fehlt die Ox-2-Domäne, während APP₆₉₅ keine der beiden zusätzlichen Domänen enthält.

1.2.1 Prozessierung von APP

APP wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, im weiteren Verlauf in ER und Golgi glykosyliert und dann an die Plasmamembran transportiert (Haass *et al.* 2012). Danach kann es über Clathrin-vermittelte Endozytose in das endosomale System aufgenommen werden und dort entweder in den Lysosomen abgebaut oder über einen Recyclingmechanismus wieder an die Zelloberfläche transportiert werden (Haass *et al.* 1992a, Nordstedt *et al.* 1993, Koo & Squazzo 1994, Yamazaki *et al.* 1996). Im Normalfall wird die extrazelluläre Ektodomäne

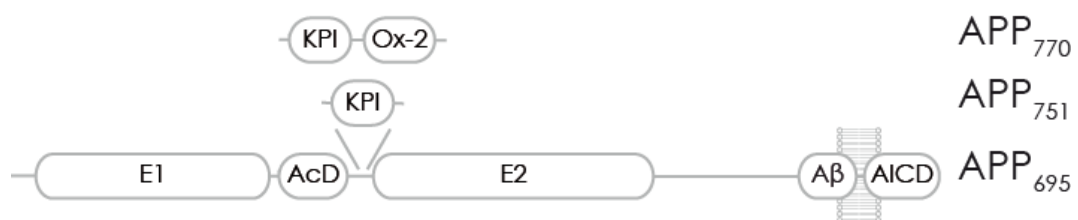


Abbildung 2: Schematische Darstellung von APP

Dargestellt sind die verschiedenen Isoformen von APP und die beinhalteten Domänen.

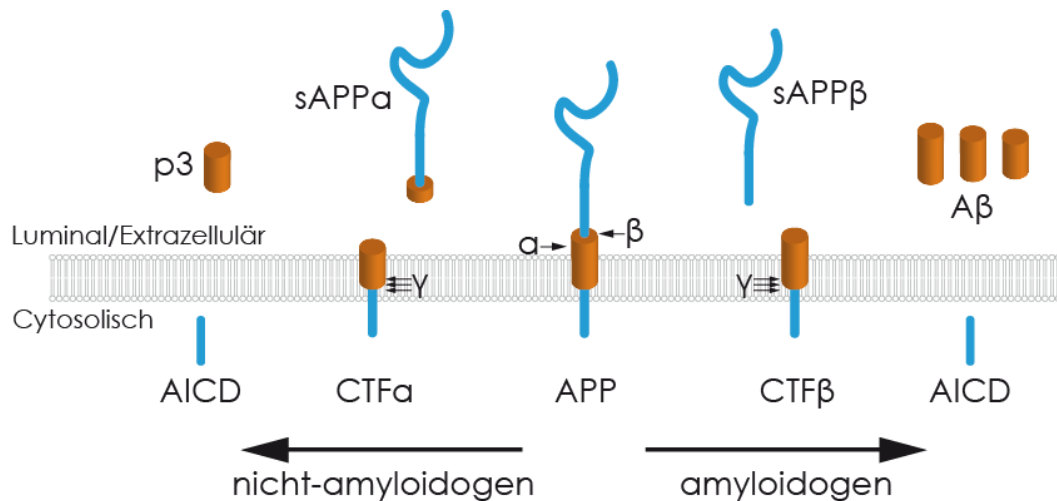


Abbildung 3: Prozessierung von APP

APP wird entweder über den amyloidogenen oder den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert. Die Ektodomäne von APP wird zuerst durch α - oder β -Sekretase abgespalten (»gesheddet«). Die entstehenden CTF α und CTF β werden dann durch die γ -Sekretase in die AICD sowie p3 bzw. A β gespalten. Die A β -Domäne ist als orangener Zylinder dargestellt.

konstitutiv von verschiedenen Proteasen abgespalten, man spricht dabei vom sogenannten »Shedding« (Abb. 3) (Esch *et al.* 1990, Sisodia *et al.* 1990, Haass & Selkoe 1993). Das verbleibende C-terminale Fragment (CTF) wird dann von dem Intramembranproteasekomplex γ -Sekretase innerhalb der TMD gespalten, wodurch zunächst die AICD in das Cytosol abgegeben wird (Gu *et al.* 2001, Sastre *et al.* 2001, Weidemann *et al.* 2002).

Bei der Spaltung von APP wird zwischen amyloidogener und nicht-amyloidogener Prozessierung unterschieden (Abb. 3). Im nicht-amyloidogenen Fall wird die Ektodomäne von Metalloproteasen der ADAM-(engl. *A Disintegrin And Metalloprotease*)-Familie, den sogenannten α -Sekretasen, abgespalten, wobei das lösliche APP-Fragment sAPP α (sekretiertes APP α) sekretiert wird (Buxbaum *et al.* 1998, Lammich *et al.* 1999). ADAM10 ist dabei die physiologisch relevante α -Sekretase (Kuhn *et al.* 2010). Das aus der Spaltung zwischen L16 und L17 (A β -Nummerierung, Abb. 3, 4) resultierende CTF α ist 83 Aminosäuren lang und wird von der γ -Sekretase in die AICD und das p3-Fragment gespalten (Haass *et al.* 1993).

Bei der amyloidogenen Prozessierung wird die APP-Ektodomäne durch die β -Sekretase BACE1 16 Aminosäuren N-terminal der α -Schnittstelle vor D682 (APP₇₇₀-Nummerierung, D1 von A β) gespalten, wobei sAPP β und das 99 Aminosäuren lange CTF β entstehen (Abb. 3, 4) (Sinha *et al.* 1999, Vassar *et al.* 1999, Yan *et al.* 1999). CTF β wird dann analog zu CTF α durch die γ -Sekretase in AICD und A β gespalten (Haass & Selkoe 1993). Nach schrittweiser Verkürzung durch die γ -Sekretase, werden schließlich A β -Peptide mit einer Länge zwischen 37 und 43 Aminosäuren sekretiert (vgl. 1.3.6). BACE1 schneidet APP alternativ zwischen Y10 und E11 (A β -Nummerierung), wobei letztendlich, aus dem entstehenden CTF β' , N-terminal verkürzte A β _{11-x}-Spezies produziert werden (Haass *et al.* 1992b, Vassar *et al.* 1999).

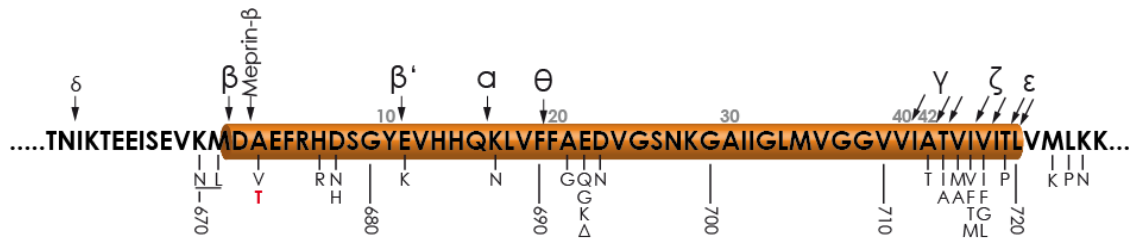


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aβ-Domäne (orange) von APP und der angrenzenden Regionen
 Oberhalb sind die Schnittstellen zur Abspaltung der Ektodomäne (α -, β -, δ -, θ -Sekretase sowie Meprin- β) und die Schnittstellen der γ -Sekretase (ϵ -, ζ - und γ -Spaltung) sowie die Aβ-Nummerierung angegeben. Im unteren Teil sind die bekannten APP-FAD-Mutationen inklusive der APP₇₇₀-Nummerierung gezeigt. Die protektive A2T Mutation ist dabei in rot dargestellt.

Physiologisch sind beide Wege, amyloidogen und nicht-amyloidogen, konstitutiv aktiv (Haass & Selkoe 1993). Die Spaltung von APP wird durch dessen Lokalisierung innerhalb der Zelle reguliert. Die nicht-amyloidogene Prozessierung findet an der Plasmamembran statt, da dort ADAMs und APP zusammen lokalisiert sind (Sisodia 1992, Lammich *et al.* 1999). BACE1 ist primär in den endosomalen Kompartimenten aktiv und kann somit nur internalisiertes APP schneiden (Vassar *et al.* 1999). Da der Großteil von APP an der Plasmamembran lokalisiert ist, ist die Aβ-Produktion davon abhängig wieviel APP internalisiert wird. Eine verstärkte Aufnahme von APP, z.B. aufgrund verstärkter neuronaler Aktivität, führt durch die erhöhte Menge an für BACE1 zugängliches Substrat somit zu einer erhöhten Aβ-Produktion (Golde *et al.* 1992, Koo & Squazzo 1994, Perez *et al.* 1999, Small & Gandy 2006, Cirrito *et al.* 2008, Sannerud & Annaert 2009, Das *et al.* 2013). Der amyloidogene Weg kann so durch Modulation der Internalisierung, z.B. durch Regulation der Retromerstabilität oder anderer für die Proteinsortierung wichtiger Proteine wie z.B. SORLA, gesteuert werden (Andersen *et al.* 2005, Mecozzi *et al.* 2014). Darüber hinaus kann die Spaltung von APP durch Bindung anderer Proteine an APP, wie etwa BRI2, physikalisch blockiert und damit gehemmt werden (Matsuda *et al.* 2008).

Zusätzlich zu α - und β -Sekretase gibt es eine Reihe weiterer APP-prozessierender Proteasen. Die Asparaginendopeptidase (AEP, δ -Sekretase) schneidet die APP-Ektodomäne etwas weiter N-terminal als BACE1 (Abb. 4). Das entstehende CTF δ ist ein amyloidogenes Substrat und wird letztlich durch BACE1 und γ -Sekretase in Aβ und AICD umgesetzt (Zhang *et al.* 2015b, Müller *et al.* 2017). Die Zink-Metalloprotease Meprin- β ist an der Plasmamembran aktiv, schneidet APP an verschiedenen Stellen der Ektodomäne und erzeugt unter anderem ein 98 Aminosäuren langes CTF (CTF β^*), das eine zusätzliche, von BACE1 unabhängig erzeugte, Aβ-Quelle darstellt (Bien *et al.* 2012). Das daraus von der γ -Sekretase produzierte, um eine Aminosäure verkürzte, Aβ* (Aβ₂₋₃) aggregiert stärker als normales Aβ und könnte so als Aggregationskeim dienen (Schönherr *et al.* 2016). BACE2, ein Homolog der β -Sekretase BACE1, schneidet APP, als sogenannte θ -Sekretase, vor Position F20, wobei das letztlich durch die γ -Sekretase produzierte Aβ-ähnliche Fragment vermutlich nicht amyloidogen ist (Sun *et al.* 2006). Zusätzlich können die Spaltprodukte von α -

und β -Sekretase durch andere Proteasen weiter gespalten werden. Matrix-Metalloproteasen spalten sAPP α/β in sogenannte A η -Peptide, wobei gezeigt werden konnte, dass das entstehende A η - α neuronale Aktivität und die Langzeitpotenzierung hemmen kann (Willem *et al.* 2015). CTF β kann auch durch Caspasen vor A69 geschnitten werden. Die daraus entstehenden N- und C-terminalen Fragmente induzieren neuronale Apoptose und könnten so durch CTF β ausgelöste Toxizität erklären (Lu *et al.* 2000, Bertrand *et al.* 2001).

1.2.2 Funktion von APP und seinen primären Spaltprodukten

Die beiden längeren APP-Isoformen (Abb. 2), APP₇₇₀ und APP₇₅₁, kommen hauptsächlich außerhalb des Gehirns vor und sind mit der Blutkoagulation assoziiert (Oltersdorf *et al.* 1989, Van Nostrand *et al.* 1991). Das kürzere APP₆₉₅ wird vor allem im Gehirn exprimiert (Kang *et al.* 1987), wobei seine genaue Funktion dort noch nicht vollständig geklärt ist. Soweit bekannt, ist APP sowohl ein wichtiger neuronaler Wachstumsfaktor, der synaptische Plastizität und Synapseneliminierung steuert, als auch ein wichtiger Faktor für Lern- und Gedächtnisprozesse, der die Stabilität und Funktionalität von Synapsen reguliert (Roch *et al.* 1994, Dawson *et al.* 1999, Seabrook *et al.* 1999, Ring *et al.* 2007, Nikolaev *et al.* 2009).

Die Funktion der einzelnen Spaltprodukte ist nicht für alle genau geklärt, die meisten haben aber vermutlich synaptische Funktionen. sAPP α scheint dabei den Großteil der synaptischen Aktivität von APP zu vermitteln und moduliert die synaptische Transmission und Plastizität oder wirkt als Wachstumsfaktor und Regulator der Synapsendichte (Roch *et al.* 1994, Furukawa *et al.* 1996, Ring *et al.* 2007, Müller *et al.* 2017, Richter *et al.* 2018, Rice *et al.* 2019). Obwohl sich sAPP α und sAPP β nur um 16 Aminosäuren unterscheiden, vermittelt sAPP β dabei nicht die gleichen Funktionen wie sAPP α (Richter *et al.* 2018). Auch die physiologische Funktion der AICD ist nicht genau bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass die sonst sehr instabile AICD durch Bindeproteine, z.B. Fe65, stabilisiert werden kann, in den Kern transportiert wird und dort als Transkriptionsfaktor agiert (Cao & Sudhof 2001, Cupers *et al.* 2001, Kimberly *et al.* 2001, Bukhari *et al.* 2017). Dies konnte jedoch in anderen Modellen nicht bestätigt werden und ist somit umstritten (Hebert *et al.* 2006, Waldron *et al.* 2008). Vermutlich ist die AICD selbst kein direkter Transkriptionsfaktor, kann jedoch durch Beeinflussung verschiedener Interaktoren transkriptionell regulierend wirken (Bukhari *et al.* 2017).

Obwohl A β vor allem wegen seiner Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung untersucht wird, ist es dennoch essenziell für verschiedene physiologische Prozesse (Brothers *et al.* 2018). So konnte unter anderem eine antimikrobielle Funktion von A β gezeigt werden. Zudem scheint A β wichtig für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke zu sein. Die wichtigste, und am intensivsten untersuchte Funktion, ist jedoch jene an der Synapse. A β wird bei synaptischer

Aktivität vermehrt sekretiert (s.o., (Kamenetz *et al.* 2003, Cirrito *et al.* 2008)) und verstärkt in pikomolaren Konzentrationen die synaptische Plastizität und die Lernleistung (Puzzo *et al.* 2008, Morley *et al.* 2010). A β ist zudem essenziell für die normale synaptische Funktion und für die bei Lernprozessen notwendige hippocampale Langzeitpotenzierung (Garcia-Osta & Alberini 2009, Morley *et al.* 2010, Puzzo *et al.* 2011). A β kommt im Gehirn in monomerer, oligomerer und fibrillärer Form vor. Dabei ist unklar welche dieser Formen für die einzelnen Funktionen und Effekte verantwortlich sind. So konnte gezeigt werden, dass monomeres oder oligomeres A β neurotoxisch wirkt, die Langzeitpotenzierung hemmt und zu neuronaler Atrophie und Dendritendegeneration führt (Yankner *et al.* 1990, Lacor *et al.* 2007, Shankar *et al.* 2008, Li *et al.* 2009). Die gegensätzlichen, neurotoxischen und für das Überleben der Zellen essenziellen, Effekte von A β scheinen komplex reguliert zu werden. Dabei ist noch nicht genau verstanden, welchen Einfluss die absolute A β -Menge oder die unterschiedlichen A β -Spezies spielen und welche weiteren Faktoren noch von Bedeutung sind. So kann Depletion von A β Neurotoxizität induzieren, welche durch Zugabe geringer, pikomolarer Mengen A β_{40} verhindert werden kann, während zugesetztes A β_{42} nur geringe Effekte zeigt (Plant *et al.* 2003). Andere Studien zeigen, dass kurze Exposition durch geringe Mengen A β_{42} die normale synaptische Funktion moduliert, während längere Exposition oder größere Mengen A β_{42} zum Funktionsverlust führen (Koppensteiner *et al.* 2016).

Es ist unklar welche der unterschiedlichen A β -Formen die letztlich für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung toxische Spezies ist, ihr Aggregationsstatus scheint aber eine entscheidende Rolle zu spielen (Shankar *et al.* 2008, Esparza *et al.* 2013, Selkoe & Hardy 2016). Besonderes Augenmerk liegt dabei auf den relativen Mengen der längeren A β_{42} -und A β_{43} -Spezies, da sie schneller aggregieren und neurotoxisch sind (Jarrett *et al.* 1993, Jarrett & Lansbury 1993, Mucke *et al.* 2000, Saito *et al.* 2011). Kürzere Spezies, wie A β_{40} , hingegen scheinen die Aggregation und Toxizität der längeren Spezies vermindern zu können (Kim *et al.* 2007, Yan & Wang 2007, Moore *et al.* 2018). Das Verhältnis zwischen längeren und kürzeren Spezies scheint entscheidend für die Toxizität sowie die Pathogenese zu sein und korreliert in verschiedenen FAD-Fällen mit dem Alter bei Krankheitsbeginn (Kuperstein *et al.* 2010, Tang & Kepp 2018). Die Identität der tatsächlich toxischen A β -Form wird allerdings immer noch diskutiert. Studien deuten aber darauf hin, dass nicht monomeres oder fibrilläres A β , sondern lösliche A β -Oligomere die entscheidende Spezies sind, also die Synpasenfunktion stören und so zu kognitiven Defiziten führen (Shankar *et al.* 2008, Koffie *et al.* 2009, Esparza *et al.* 2013).

1.3 Die Präseniline und der Intramembranproteasekomplex γ -Sekretase

1.3.1 Intramembranproteolyse

1836 wurde Pepsin als Protein abbauender »eigentümlicher Stoff« des Magensafts identifiziert und war so die erste Protease, die wissenschaftlich beschrieben wurde (Schwann 1836). Nach mehr als 180 Jahren weiterer Forschung wurden bis heute etwa 600 Gene des menschlichen Genoms identifiziert, die für Proteasen kodieren (Lopez-Otin & Bond 2008), die in die Regulation vieler Signalwege und sonstiger zellulärer Funktionen involviert sind. Da die Spaltung von Peptidbindungen durch Proteasen irreversibel ist, dient sie oft als An/Aus-Schalter für Signalwege, weshalb die verantwortlichen Proteasen sehr gut reguliert sein müssen. Fehlfunktionen der Proteasen oder ihrer Regulation sind daher die molekulare Grundlage vieler Krankheiten.

Eine spezielle Untergruppe sind die Intramembranproteasen (IMPs). Ihre Substrate sind Proteine mit integralen TMDs oder Membranankern, die innerhalb der Membranebene gespalten werden (Verhelst 2017). Die Site-2-Protease, eine Zink-Metalloprotease, wurde 1997 als erste IMP entdeckt (Rawson *et al.* 1997). Sie schneidet beispielsweise Transkriptionsfaktoren der Lipidsynthese, sodass deren intrazelluläre Domänen (ICDs, engl. *intracellular domains*) in den Zellkern gelangen und dort regulatorisch aktiv werden können (Rawson 2013). Wie bei der Prozessierung von APP wird das Substrat zuerst von einer anderen Protease geschnitten bevor der verbleibende Rest durch die IMP innerhalb der Membran gespalten werden kann. Diese Form der Prozessierung wird regulierte Intramembranproteolyse (RIP) genannt und findet sich als verbindendes Muster bei einigen IMPs (Brown *et al.* 2000). Eine weitere Klasse sind die Serinproteasen der Rhomboid-Familie, deren Mitglieder z.B. in die Proteindegradation im ER involviert sind oder, im Fall der mitochondrialen Protease PARL, mit der Entstehung der Parkinson-Krankheit und Typ-2 Diabetes assoziiert werden (Lee *et al.* 2001a, Urban *et al.* 2001, Fleig *et al.* 2012, Chan & McQuibban 2013). Rce1 (engl. *Ras and a-factor-converting enzyme 1*) ist eine Glutamy-Protease, die den C-terminalen Anker von Ras spaltet und so dessen Lokalisierung reguliert. Diese untypische IMP wurde erst nach Lösung der Struktur als IMP identifiziert und ist, anders als die anderen IMPs, eine reine Carboxypeptidase und schneidet nicht innerhalb einer TMD (Boyartchuk *et al.* 1997, Manolaridis *et al.* 2013). Die letzte Klasse der IMPs sind die Aspartylproteasen. Deren Mitglieder, die Präseniline und die SPP-(Signalpeptidpeptidase-) Familie, besitzen zwei katalytische Aspartatylreste im aktiven Zentrum, wobei das zweite Aspartat in ein GxGD-Motiv eingegliedert ist (Steiner *et al.* 2000, Voss *et al.* 2013). Die Aspartate

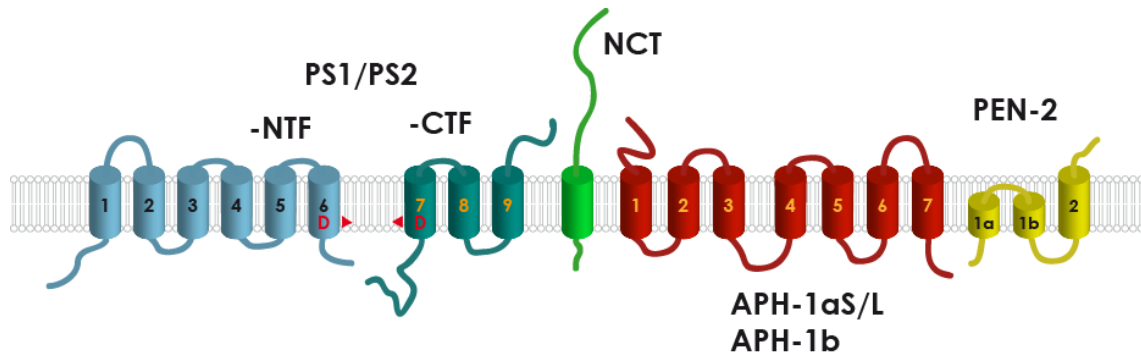


Abbildung 5: Schematische Übersicht der verschiedenen Untereinheiten der γ -Sekretase

Dargestellt sind NCT (grün), APH-1 (dunkelrot), PEN-2 (gelb), sowie die katalytische Untereinheit Präsenilin (PS1/2). Diese trägt die aktiven Aspartatyl-Reste (rot) und ist in NTF (hellblau) sowie CTF (blaugrün) gespalten.

sind in der Lage Wasser zu polarisieren und so die Peptidbindung des Substrats zu hydrolysieren (Erez *et al.* 2009). Die Präseniline spalten Typ-I-Transmembranproteine mit kurzer oder abgespaltener Ektodomäne. Die Proteasen der SPP-Familie haben eine im Vergleich zu Präsenilinen umgedrehte Topologie und spalten Typ-II-Membranproteine, also Proteine, die einen cytosolischen N- und einen luminalen/extrazellulären C-Terminus besitzen. SPP entfernt die abgespaltenen Signalpeptide aus der ER-Membran und ist an der ER-assoziierten Proteindegradation beteiligt (Weihofen *et al.* 2000, Weihofen *et al.* 2002, Voss *et al.* 2013, Chen *et al.* 2014). Ein anderes Mitglied dieser Familie, SPP-like 3, ist in die Regulation der Proteinglykosylierung involviert und kann auch Substrate mit langer Ektodomäne spalten und ist daher selbst eine sogenannte »Sheddase« (Voss *et al.* 2014).

1.3.2 Die Untereinheiten des γ -Sekretasekomplexes

Die γ -Sekretase ist ein Proteinkomplex aus vier integralen Membranproteinen mit insgesamt 18 ganzen und zwei halben TMDs (Abb. 5) (Edbauer *et al.* 2003, Kimberly *et al.* 2003, Takasugi *et al.* 2003). Die verschiedenen Untereinheiten sind Präsenilin, PEN-2 (engl. *presenilin enhancer 2*), Nicastrin (NCT) und APH-1 (engl. *anterior pharynx-defective 1*). Der Mensch besitzt zwei Präsenilin-Homologe, PS1 und PS2, mit 467 (PS1) bzw. 448 (PS2) Aminosäuren und neun TMDs. Sie sind die katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes, wobei die zwei funktionellen Aspartate in den TMDs 6 und 7 liegen (Steiner *et al.* 1999a, Wolfe *et al.* 1999, Kimberly *et al.* 2000). Das für die Proteolyse notwendige Wasser erreicht das aktive Zentrum dabei über Poren zwischen den TMDs (Lazarov *et al.* 2006, Sato *et al.* 2006, Tolia *et al.* 2006, Osenkowski *et al.* 2009). Während der Komplexbildung im ER wird Präsenilin autokatalytisch zwischen T291 und A299 (PS1) in der langen cytosolischen Schleife zwischen den TMDs 6 und 7 endoproteolysiert (Thinakaran *et al.* 1996, Podlisny *et al.* 1997, Wolfe *et al.* 1999). Die daraus resultierenden N- und C-terminalen Fragmente (NTF bzw. CTF) bleiben danach im Komplex gebunden. Obwohl die

Endoproteolyse Teil der normalen Reifung des γ -Sekretasekomplexes ist, gibt es Mutanten, wie z.B. PS1 M292D, die trotz ungespaltenen Präsenilins eine normale Aktivität zeigen (Steiner *et al.* 1999c). In anderen Fällen, wie PS1 R278I, konnte die reduzierte Endoproteolyse mit einer verringerten Proteaseaktivität assoziiert werden (Saito *et al.* 2011).

NCT ist ein 709 Aminosäuren großes Typ-I-Membranprotein, somit die größte Untereinheit des Komplexes, und besitzt eine große N-terminale Ektodomäne, die im Zuge der Komplexbildung glykosyliert wird (Yu *et al.* 2000). Die Glykosylierung von NCT beginnt nach dem Aufbau des Komplexes im ER und wird nach dem darauffolgenden Transport des Komplexes in den Golgi dort abgeschlossen (Edbauer *et al.* 2002, Leem *et al.* 2002, Capell *et al.* 2005). Da verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, ist bisher nicht endgültig geklärt, ob die abgeschlossene Glykosylierung essentiell für die volle Aktivität der γ -Sekretase ist oder ob Zwischenstufen der Glykosylierung ausreichend sind, einen funktionellen γ -Sekretasekomplex zu bilden (Yang *et al.* 2002, Herreman *et al.* 2003, Dries & Yu 2008, López *et al.* 2015, Moniruzzaman *et al.* 2018). Das Protein APH-1 besitzt sieben TMDs und spielt vermutlich eine wichtige Rolle für die Stabilität und die korrekte Struktur des Komplexes (Francis *et al.* 2002, Goutte *et al.* 2002, Lee *et al.* 2002). Der Mensch besitzt zwei Homologe, APH-1a und APH-1b (Francis *et al.* 2002, Gu *et al.* 2003), wobei APH-1a zusätzlich noch als große und kleine Splicevariante (APH-1aL/S) gebildet wird. Zusammen mit den beiden Präsenilin-Homologen ermöglicht APH-1 so die Bildung verschieden zusammengesetzter γ -Sekretasekomplexe (Hebert *et al.* 2004, Shirotani *et al.* 2004, Serneels *et al.* 2009). Die vierte γ -Sekretaseuntereinheit ist PEN-2 (Francis *et al.* 2002, Steiner *et al.* 2002). Es besitzt eine komplette TMD sowie zusätzlich eine in der Membran liegende Haarnadelstruktur aus zwei halben TMDs (Sun *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2015a). PEN-2 bindet an Präsenilin, induziert dabei dessen Endoproteolyse (Luo *et al.* 2003, Takasugi *et al.* 2003) und stabilisiert mit seinem C-Terminus den entstehenden Komplex mit dem Präsenilin-NTF und -CTF (Hasegawa *et al.* 2004, Prokop *et al.* 2004, Prokop *et al.* 2005). Zusätzlich scheint PEN-2 die Struktur des aktiven Zentrums verändern zu können und so die Aktivität des Komplexes zu modulieren (Shiraishi *et al.* 2004, Isoo *et al.* 2007). Im Zuge der Komplexbildung bindet APH-1 zuerst an NCT, bevor dieser Subkomplex zusätzlich Präsenilin und PEN-2 bindet (LaVoie *et al.* 2003, Fraering *et al.* 2004, Capell *et al.* 2005). Danach wird der Komplex vom ER in den Golgi transportiert, wo als letzter Schritt der Komplexbildung die NCT-Glykosylierung abgeschlossen wird (Dries & Yu 2008).

1.3.3 Zelluläre Lokalisation der γ -Sekretase

Nach der Komplexbildung in ER und Golgi wird die γ -Sekretase in verschiedene Zellkompartimente transportiert. Ein Teil der γ -Sekretase befindet sich an der Plasmamembran

(Kaether *et al.* 2002, Chyung *et al.* 2005), während eine zweite Population in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist (Pasternak *et al.* 2003). Die unterschiedliche Lokalisierung basiert auf der Zusammensetzung der einzelnen Komplexe. PS1-haltige Komplexe sind im kompletten sekretorischen System und an der Plasmamembran lokalisiert, während PS2-Komplexe primär in späten Endosomen und Lysosomen vorkommen (Meckler & Checler 2016, Sannerud *et al.* 2016). Da PS2-Komplexe so einen Großteil des intrazellulären A β produzieren und diese intrazellulären Formen meist länger sind als die sekretierten, könnte dieser endosomale A β -Pool von besonderer Bedeutung für die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung sein (Sannerud *et al.* 2016).

Innerhalb der Membran befindet sich die γ -Sekretase meist in, gegenüber Detergenzien resistenten, Subdomänen wie Tetraspanin-reichen Mikrodomänen oder auch sogenannten »lipid rafts« (Wahrle *et al.* 2002, Vetrivel *et al.* 2004, Hur *et al.* 2008, Wakabayashi *et al.* 2009). Die erhöhten Cholesterin- und Sphingolipidspiegel dieser Subdomänen erhöhen die Aktivität der Protease und beeinflussen die A β -Produktion (Ehehalt *et al.* 2003, Osenkowski *et al.* 2008, Vetrivel & Thinakaran 2010). Einige Studien legen nahe, dass sich innerhalb dieser Subdomänen Multiproteasekomplexe aus α - bzw. β -Sekretase sowie γ -Sekretase bilden, in denen die Substrate sequenziell von den Proteasen gespalten werden können (Chen *et al.* 2015, Liu *et al.* 2019).

1.3.4 Eigenschaften der γ -Sekretasesubstrate

Seit der letzten großen Übersicht 2011 (Haapasalo & Kovacs 2011) wurden weitere Substrate entdeckt, womit Stand heute über 100 Substrate der γ -Sekretase bekannt sind. Die entscheidenden Faktoren für die Substratspezifität der γ -Sekretase sind dabei noch unklar. Es ist keine klassische Erkennungs- oder Spaltsequenz bekannt (Beel & Sanders 2008). Dennoch können einige Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Die γ -Sekretase schneidet nur Typ-I-Transmembranproteine, die entweder natürlicherweise eine kurze Ektodomäne haben oder bei denen die Ektodomäne vorher durch weitere Proteasen, z.B. ADAMs oder BACE1, abgespalten wurde (Haapasalo & Kovacs 2011, Lichtenthaler *et al.* 2011, Laurent *et al.* 2015). Die meisten ICDs, die bei der Spaltung durch die γ -Sekretase im Zuge der RIP entstehen, sind instabil und werden schnell abgebaut. Bei bestimmten Substraten, wie etwa Notch1 und N-Cadherin konnte eine transkriptionelle Aktivität der entstehenden ICDs nachgewiesen werden, während in anderen Fällen, wie dem DCC-CTF, die Spaltung des CTFs Signalwege abschalten kann (De Strooper *et al.* 1999, Marambaud *et al.* 2003, Jurisch-Yaksi *et al.* 2013). Dabei wird davon ausgegangen, dass es noch weitere Substrate gibt, bei denen ICD und/oder CTF wichtige Signalmoleküle sind, die über die Spaltung durch die γ -Sekretase reguliert werden können. Durch die Vielzahl an Substraten spielt die γ -Sekretase eine wichtige Rolle bei verschiedensten physiologischen

Prozessen und damit verbundenen Krankheitsbildern wie z.B. in der Neuro- und Synaptogenese, der Modulation des Wachstums von Axonen, der Regulation des kardiovaskulären Systems sowie bei verschiedenen Krebsformen (Jurisch-Yaksi *et al.* 2013).

Die essenzielle Funktion von Präsenilin zeigt sich auch bei PS1-knock-out-(KO-)Mäusen, also transgenen Mäusen, denen beide Kopien des *PSEN1*-Gens fehlen. Sie sterben kurz vor oder nach der Geburt und zeigen abnorme Skelettentwicklung und Neurodegeneration bzw. gestörte neuronale Entwicklung (Shen *et al.* 1997, Wong *et al.* 1997). Dieser Phänotyp ist sehr ähnlich zu dem der Notch1-KO-Mäusen, die ebenfalls vor der Geburt sterben und eine stark beeinträchtigte Embryonalentwicklung aufweisen (Swiatek *et al.* 1994, Conlon *et al.* 1995). Da Notch1 ein Substrat der γ -Sekretase ist (Schroeter *et al.* 1998, De Strooper *et al.* 1999) und die Phänotypen der KO-Mäuse so ähnlich sind, werden die starken Phänotypen der PS1-KO-Mäuse primär mit der Unterbrechung des Notch1-Signalweges erklärt (Shen *et al.* 1997, Wong *et al.* 1997). Notch1 ist ein evolutionär konserviertes Signalmolekül multizellulärer Organismen, dessen ICD im Zuge der Signalaktivierung durch RIP in das Cytosol freigegeben wird und in der Folge im Zellkern Zielgene reguliert (De Strooper *et al.* 1999, Struhl & Greenwald 1999, Andersson & Lendahl 2014). Während der Entwicklung reguliert Notch Zelldifferenzierung und -proliferation sowie die Entscheidung welche Zellen überleben oder sterben (Zellschicksal) (Jurisch-Yaksi *et al.* 2013, Andersson & Lendahl 2014). Darüber hinaus beeinflusst Notch in Erwachsenen wichtige Funktionen, wie die Differenzierung von Immunzellen, Stammzellerhaltung oder die Selbsterneuerung von Organen wie z.B. der Haut (Sato *et al.* 2012). Die essenzielle Bedeutung von Notch für die Regulation von Stammzellen und Zellproliferation führt dazu, dass eine deregulierte Notch-Signaltransduktion bei vielen Krebsarten von Bedeutung ist (Jurisch-Yaksi *et al.* 2013, Andersson & Lendahl 2014). So besitzt Notch1 eine Sonderstellung unter den Substraten der γ -Sekretase, dessen vielfältige Funktionen bei möglichen, die γ -Sekretase betreffenden, Medikamenten bedacht werden müssen.

1.3.5 Substraterkennung und Struktur der γ -Sekretase

Trotz der Variabilität der Substrate spielt die Architektur des aktiven Zentrums eine Rolle bei der Entscheidung, ob bestimmte Proteine gespalten werden können oder nicht. Das konservierte GxGD-Motiv in TMD7 von Präsenilin beinhaltet eines der aktiven Aspartate und zwei für die Aktivität der Protease wichtige Glycine, die beide nur bedingt verändert werden können (Steiner *et al.* 2000, Pérez-Revuelta *et al.* 2010). Bestimmte Substitutionen an der X-Position des Motivs können dabei eine Art Substratselektivität erzeugen, welche die Spaltung von CD44 und Notch1 reduziert, während die von APP weniger beeinträchtigt wird (Yamasaki *et al.* 2006, Kretner *et al.* 2013). Innerhalb des aktiven Zentrums wurden zudem vor Kurzem Bindetaschen identifiziert,

welche selektiv nur bestimmte Aminosäuresubstitutionen im APP akzeptieren, während andere zu einer veränderten Spaltung führen oder diese komplett verhindern (Bolduc *et al.* 2016b, Hitzengerger & Zacharias 2019). Diese, auf Untersuchungen mit APP basierenden, Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das aktive Zentrum trotz der vielen verschiedenen Substrate eine gewisse Präferenz bzw. Selektivität für bestimmte Aminosäuren hat. Dies könnte die Basis dafür sein, dass verschiedene Substrate zwar generell, teils jedoch unterschiedlich effizient geschnitten und in der Folge verändert prozessiert werden können.

Trotz dieser Einschränkungen wird die Substratauswahl vor allem durch die Lokalisierung der Substrate und die notwendige Abspaltung der Ektodomäne reguliert. Substrate mit kurzer Ektodomäne (15-30 Aminosäuren) werden deutlich besser geschnitten als solche mit Ektodomänen, die länger als 50 Aminosäuren sind (Struhl & Adachi 2000, Funamoto *et al.* 2013, Bolduc *et al.* 2016a). Die große N-terminale Ektodomäne von NCT wurde als Substratrezeptor vorgeschlagen (Shah *et al.* 2005), wobei die Details dieses Mechanismus kontrovers diskutiert wurden (Chavez-Gutierrez *et al.* 2008, Dries *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2010, Petit *et al.* 2019). Neuere Studien zeigen, dass NCT rekombinant aufgereinigtes APP-C100-His₆, ein APP-CTF β -Derivat mit N-terminalem Methionin und C-terminalem Affinitäts-Tag (im Folgenden C99 genannt), bindet (Fukumori & Steiner 2016). Zudem wird davon ausgegangen, dass die NCT-Ektodomäne die Länge der Substrate sterisch reguliert, indem zu lange N-termini blockiert werden (Bolduc *et*

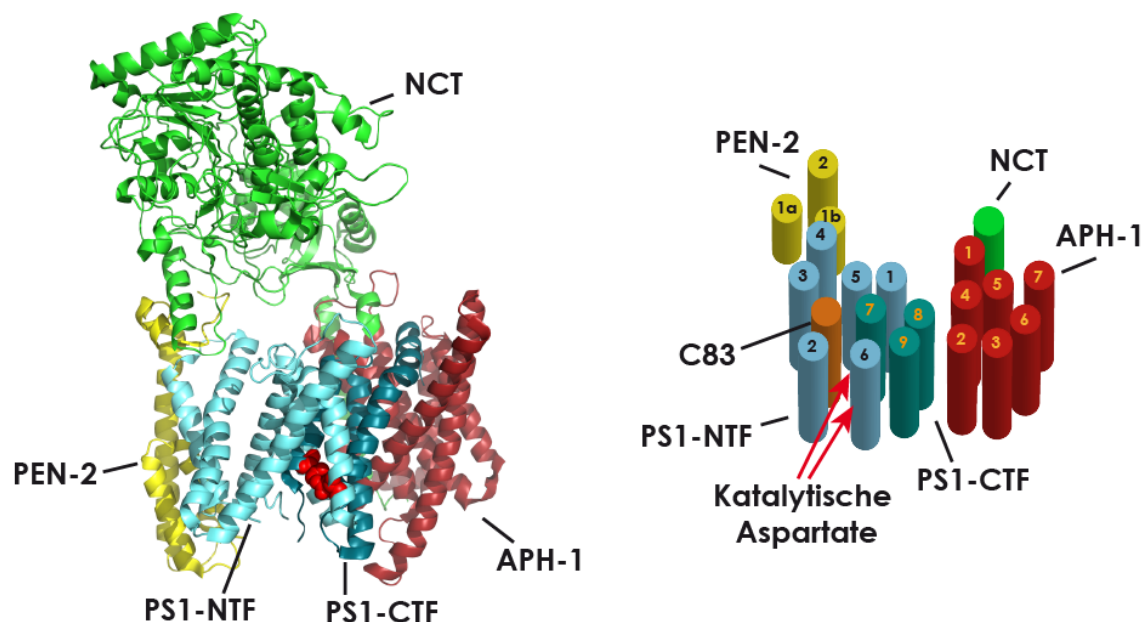


Abbildung 6: Struktur der γ -Sekretase

Links: Cartoon-Darstellung der Kryo-EM-Struktur (PDB: 5FN3) der γ -Sekretase (NCT (grün), APh-1 (dunkelrot), PEN-2 (gelb), PS1-NTF (hellblau), -CTF (blaugrün)). Die katalytisch aktiven Aspartate sind als rote Sphären dargestellt.

Rechts: Schematische Aufsicht (nach PDB 6IYC) auf die in der Membranebene liegende γ -Sekretase mit gebundenem C83 (CTF α)-Substrat. Die Untereinheiten bilden eine hufeisenförmige Struktur mit NCT und PEN-2 an den beiden Enden. Das aktive Zentrum um die Präsenilin-TMDs 6 und 7 liegt dabei auf der Außenseite des Hufeisens.

al. 2016a).

Diese Hypothese wurde von der kürzlich gelösten Kryo-EM-Struktur des γ -Sekretasekomplexes (Abb. 6) (Bai *et al.* 2015b), sowie den ebenfalls veröffentlichten Co-Strukturen mit Notch1-100, einem Notch1-Fragment, das die TMD und die Juxtamembranregionen von Notch1 umfasst (Yang *et al.* 2019), bzw. APP-CTF α (C83) (Abb. 7) (Zhou *et al.* 2019) bestätigt. Die TMDs der γ -Sekretase liegen in Hufeisenform in der Membran und werden von der NCT-Ektodomäne wie durch eine Kappe auf extrazellulärer Seite abgedeckt (Abb. 6). Das aktive Zentrum liegt dabei nicht im Inneren des Hufeisens, sondern auf seiner Außen- bzw. Rückseite. Die potenziellen Substrateintrittsstellen liegen so auf der Außenseite zwischen TMDs 2 und 3 oder TMDs 2 und 6 (Bai *et al.* 2015b). Interessanterweise besitzt die γ -Sekretase eine große konformationelle Heterogenität, die sich in einer Vielzahl alternativ vorhandener Strukturen zeigt, die z.B. durch Bindung von Inhibitoren induziert werden (Li *et al.* 2014, Bai *et al.* 2015a, Elad *et al.* 2015).

In den Co-Strukturen zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen der Bindung von Notch1-100 und C83, was für eine gewisse Toleranz der Struktur des aktiven Zentrums bezüglich verschiedener Substrate spricht (Yang *et al.* 2019, Zhou *et al.* 2019). Die kurzen N-Termini der Substrate ragen in einen Hohlraum, der von NCT über der Membranebene gebildet wird, was eine Funktion von NCT als sterischen Regulator der Substratbindung nahelegt. Da die Substrate allerdings im Zuge der Aufreinigung kovalent an die, zwischen den TMDs 1 und liegende, extrazelluläre Schleife 1 von PS1 gebunden wurden und so die Region artifiziell verändert wurde,

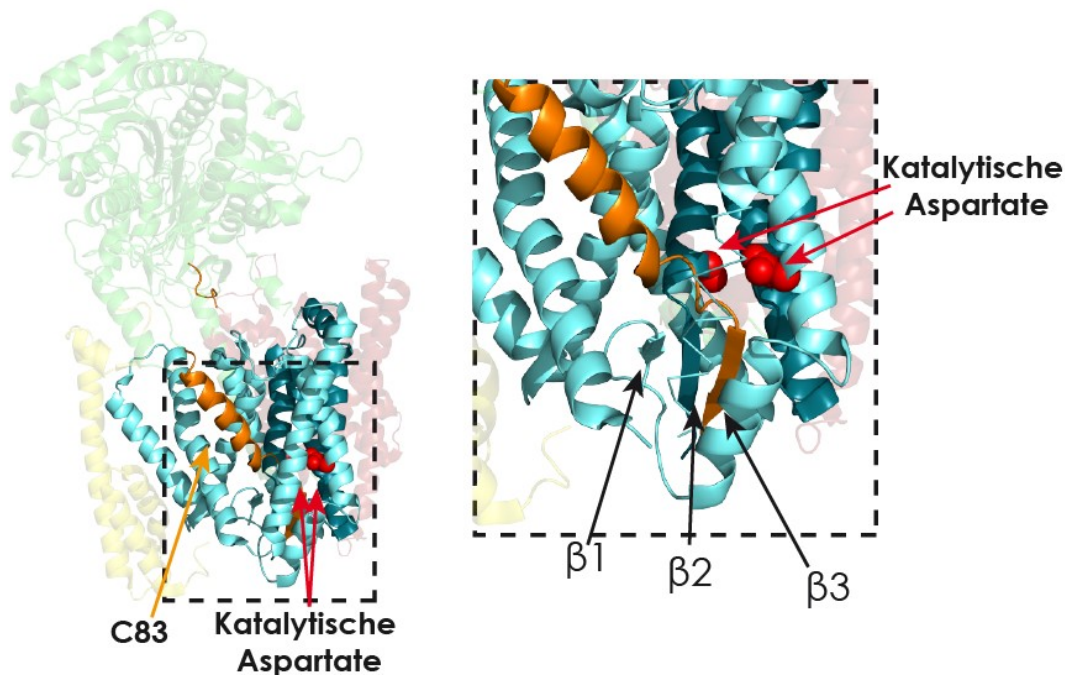


Abbildung 7: Kryo-EM-Struktur der γ -Sekretase mit gebundenem CTF α (C83, orange) (PDB: 6IYC)

Die nicht-katalytischen Untereinheiten sind leicht transparent dargestellt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das aktive Zentrum mit dem aufgewundenen Substrat nahe der katalytischen Aspartate (rote Sphären) und den neu ausgebildeten β -Strängen $\beta 1$ (NTF), $\beta 2$ (CTF) und $\beta 3$ (C83). Zur besseren Darstellung des aktiven Zentrums sind Teile der TMD2 (NTF) nur als dünnes Band gezeigt.

können keine genauen Erkenntnisse über spezielle Interaktionen des Substrats mit NCT oder der ersten PS1-Schleife gewonnen werden. In der Membranebene liegen die Substrate zwischen den TMDs 2 und 3 (vgl. Abb. 6, 7), wobei sich die Frage stellt, wie das Substrat an dieser Stelle in den Komplex hineingelangen und die Schleife zwischen den beiden TMDs überwinden kann. Daher scheinen andere mögliche Eintrittsstellen, wie etwa zwischen den TMDs 2 und 6, trotz der sterischen Hinderung durch die Schleife 1 wahrscheinlicher (Yang *et al.* 2019). Biochemische Versuche, die die Bindung von C99 an die γ -Sekretase untersuchten, haben nahegelegt, dass NCT und PEN-2 eine vom aktiven Zentrum unabhängige Substratbindungsstelle (Exosite) bilden (Fukumori & Steiner 2016). Nach dieser initialen Bindung gelangt das Substrat vom Komplex über eine weitere Exosite im Präsenilin-NTF zum aktiven Zentrum. Der genaue Mechanismus der Translokation des Substrats ins aktive Zentrum ist zurzeit jedoch noch nicht geklärt.

Die strukturellen Daten (Zhou *et al.* 2019) passen gut zu biochemischen Ergebnissen, die eine großflächige Interaktion der TMD von C99 mit dem PS1-NTF zeigen (Fukumori & Steiner 2016). So wurde V44, der Hauptinteraktionspunkt in den biochemischen Experimenten, auch in der Struktur als Interaktionspunkt zwischen Substrat und TMD 3 von PS1 identifiziert (Zhou *et al.* 2019). Die detaillierte Struktur des aktiven Zentrums ist schwierig zu interpretieren, da nur die Struktur der inaktiven PS1 D385A Mutante gelöst werden konnte, in der eines der katalytischen Aspartate mutiert ist. Der C-Terminus des gebundenen Substrats zeigt jedoch überraschende Details (Abb. 7). Neben der aufgewundenen Helix im Bereich der Spaltstellen, die eine Spaltung an dieser Stelle erst ermöglicht, bildet der Bereich C-terminal davon einen neuen β -Strang (β_3 , Abb. 7), der von ebenfalls neu gebildeten β -Strängen des PS1-NTF (β_1) und -CTF (β_2) stabilisiert wird. Die Bindung des Substrats an dieser Nahtstelle zwischen PS1-NTF und -CTF deckt sich mit den biochemischen C99-Bindungsdaten (Fukumori & Steiner 2016, Zhou *et al.* 2019). Diese Region des Präsenilin/Substrat-Komplexes scheint wichtig für die Substratbindung und -spaltung zu sein und umfasst neben den cytosolischen Enden der TMDs 6 und 7, welche die neuen β -Stränge ausbilden, auch das konservierte PAL-Motiv am Anfang von TMD 9. Dies bestätigt ältere Daten, die eine Beteiligung des PAL-Motivs am aktiven Zentrum nahelegten, da Substitutionen in diesem Motiv die Aktivität des Komplexes reduzieren, ohne dabei die Komplexbildung zu stören (Kaether *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004, Wang *et al.* 2006, Sato *et al.* 2008).

1.3.6 Spaltmechanismus der γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist ein bifunktionales Enzym. Ihre Endopeptidase-Aktivität spaltet zuerst die ICD ab, bevor der C-Terminus des neu entstandenen N-terminalen Fragments durch ihre Carboxypeptidase-Aktivität schrittweise um weitere 6-12 Aminosäuren verkürzt wird. Das dabei entstehende Fragment wird letztlich sekretiert. Der sequenzielle Mechanismus ist vermutlich

nicht auf APP begrenzt, sondern tritt sehr wahrscheinlich auch bei anderen Substraten, wie Notch1, auf (Okochi *et al.* 2006). Im Folgenden wird er exemplarisch anhand der Spaltung des CTF β in A β und die AICD beschrieben.

Im ersten Schritt (Abb. 8), der so genannten ϵ -Spaltung, wird das CTF β hinter L49, bzw. zu einem kleineren Teil auch hinter T48, geschnitten. Dabei werden zwei verschiedene AICDs, AICD₅₀ und AICD₅₁, in das Cytosol abgegeben (Gu *et al.* 2001, Sastre *et al.* 2001, Yu *et al.* 2001, Weidemann *et al.* 2002). Diese Spaltstelle entspricht der Spaltung von Notch1 an der »site 3« welche zur Abspaltung der transkriptionell aktiven Notch1-ICD (NICD) führt (Schroeter *et al.* 1998, Sastre *et al.* 2001). Die aus der ϵ -Spaltung resultierenden 48 bzw. 49 Aminosäuren langen N-terminalen A β -Fragmente (A β ₄₈, A β ₄₉) werden in der Zelle hauptsächlich zu A β ₄₀, sowie A β ₃₈ und A β ₄₂ prozessiert (Abb. 9) (Takami *et al.* 2009, Matsumura *et al.* 2014). Ausgehend von A β ₄₉ erzeugt die sogenannte ζ -Spaltung A β ₄₆. Sukzessive werden weitere Tripeptide von A β ₄₆ abgespalten (γ -Spaltung), wobei erst A β ₄₃, dann A β ₄₀ und in der Folge zu einem kleinen Teil A β ₃₇ entsteht (Zhao *et al.* 2004, Qi-Takahara *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Yagishita *et al.* 2006). Analog dazu kann A β ₄₈ über A β ₄₅ zu A β ₄₂ verkürzt werden (Yagishita *et al.* 2006). Die verschiedenen A β -Spezies werden also über zwei Produktlinien gebildet. Neben den Tripeptiden können bei der Prozessierung auch längere Peptide abgespalten werden. Das Tetrapeptid VVIA entspricht dabei der Spaltung von A β ₄₂ zu A β ₃₈ (Takami *et al.* 2009). Zusätzlich kann A β ₃₈ auch, durch Abspaltung eines Pentapeptids (VVIAT), aus A β ₄₃ entstehen. In der Zelle sind dabei beide Wege etwa gleich wichtig (Okochi *et al.* 2013). Die von A β ₄₉ ausgehende A β ₄₀-Produktlinie ist die stärker genutzte Linie und führt zum Hauptprodukt A β ₄₀. Die A β ₄₂-Produktlinie ist die Nebenlinie und produziert A β ₄₂ und A β ₃₈, die zusammen etwa 10-20 % des sekretierten A β ausmachen. Zusätzlich zu den beiden Hauptproduktlinien können weitere Tri-, Tetra-, Penta- und Hexapeptide abgespalten werden. Dies führt zur Produktion weiterer A β -Spezies und/oder ermöglicht den Wechsel zwischen den Produktlinien, was ein komplexes Gesamtbild mit vielen möglichen Zwischen- und Endprodukten ergibt (Matsumura *et al.* 2014, Olsson *et al.* 2014). Dieses komplexe Netzwerk kann auf verschiedenen Wegen moduliert werden und so entweder die Wahl der Produktlinie, womit die A β ₄₀-Linie nicht mehr die Hauptlinie darstellt, oder die Prozessivität der sequenziellen



Abbildung 8: ϵ -Spaltung des APP-CTF β

Bei der ϵ -Spaltung schneidet die γ -Sekretase APP-CTF β vor V50 oder L49 und erzeugt dadurch die freigegebene AICD sowie A β ₄₉ (Hauptprodukt) und A β ₄₈ (Nebenprodukt), welche dann im Folgenden zu kürzeren A β -Spezies weiterprozessiert werden.

ζ - bzw. γ -Spaltung verändern. Diese Modulation der Prozessivität der γ -Sekretase verursacht Verschiebungen zwischen den relativen Mengen der unterschiedlich langen A β -Spezies. Die Interaktion der Juxtamembrandomäne des Substrats mit dem extrazellulären Bereich der γ -Sekretase, vor allem mit Präsenilin und NCT, ist dabei entscheidend für die Effizienz der schrittweisen Verkürzung von A β (Murphy *et al.* 1999, Ren *et al.* 2007, Page *et al.* 2010, Kukar *et al.* 2011, Ousson *et al.* 2013, Jung *et al.* 2014, Petit *et al.* 2019). Mutanten in diesem Bereich, z.B. am K28 oder im NCT, beeinflussen diese Interaktion und damit die N-terminale Verankerung des Substrats in der Protease und verändern so die Länge der produzierten A β -Spezies. Die variable Zusammensetzung der γ -Sekretasekomplexe aus den verschiedenen Präsenilin- und A β -1-Formen könnte ebenfalls zu veränderten A β -Profilen führen. Die Studien dazu ergeben allerdings kein eindeutiges Bild, was eventuell durch unterschiedliche experimentelle Systeme erklärbar ist. Einige Gruppen konnten zeigen, dass γ -Sekretasekomplexe, die A β -1B enthalten, erhöhte Mengen der längeren A β -Spezies produzieren (Serneels *et al.* 2009, Acx *et al.* 2014, Meckler & Checler 2016), während andere Gruppen keine relevante Änderung der A β -Produktion erkennen konnten (Shirotani *et al.* 2007, Ebke *et al.* 2011, Siegel *et al.* 2017). Eine erhöhte Produktion längerer Spezies wurde zwar auch für PS2-haltige Komplexe beschrieben,

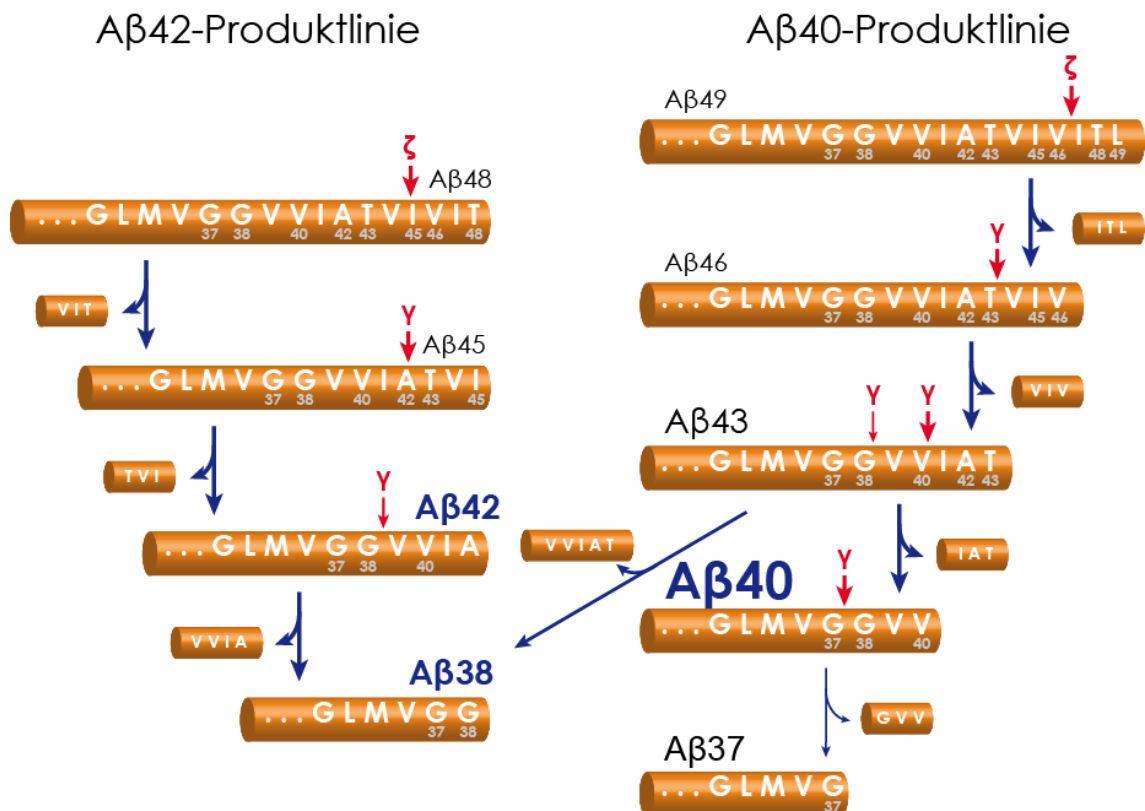


Abbildung 9: Schematische Übersicht der schrittweisen Prozessierung von A β

Die schrittweise Abspaltung kurzer Peptide erzeugt kürzere A β -Spezies. A β ₄₉ und A β ₄₈ werden dabei in zwei verschiedenen Produktlinien prozessiert. Die A β ₄₀-Produktlinie erzeugt von A β ₄₉ ausgehend durch die ζ -Spaltung A β ₄₆ und durch die nachfolgende γ -Spaltung A β ₄₃, A β ₄₀ und A β ₃₇, wobei A β ₄₀ das Hauptprodukt ist. In der A β ₄₂-Produktlinie wird analog A β ₄₈ erst zu A β ₄₅, dann zu gleichen Mengen A β ₄₂ und A β ₃₈ verkürzt. A β ₃₈ kann dabei auch aus A β ₄₃ entstehen.

konnte aber in anderen Studien nicht oder nur in sehr geringem Maße bestätigt werden (Cheng *et al.* 2009, Acx *et al.* 2014, Sannerud *et al.* 2016). Eine saure Umgebung (pH 5,5) führt im Vergleich zu basischeren Bedingungen zur verstärkten Nutzung der A β ₄₂-Produktlinie (Siegel *et al.* 2017). Die Wahl der Produktlinie ist jedoch auch vom Substrat selbst abhängig. So werden verschiedene APP-CTFs unterschiedlich prozessiert. CTF β wird stärker über die A β ₄₂-Linie prozessiert als CTF α . Das von BACE1 durch eine alternative Spaltung erzeugte CTF β' (Abb. 5) ist sogar noch stärker auf die A β ₄₂-Linie verschoben (Siegel *et al.* 2017).

Veränderungen in Substrat, Protease und Umgebungsbedingungen können also den Enzym-Substrat-Komplex so beeinflussen, dass der Spaltmechanismus der γ -Sekretase moduliert wird und somit die A β -Profile und/oder die Gesamtaktivität verändert.

1.4 Auswirkungen der FAD-Mutationen

Wie eingangs beschrieben, können bestimmte Mutationen in den Proteinen APP, PS1 und PS2 die vererbte Form der Alzheimer-Erkrankung auslösen. Der potenzielle Wirkmechanismus dieser FAD-Mutationen ist im Folgenden beschrieben.

1.4.1 APP als Auslöser der Alzheimer-Erkrankung

Alle APP Mutationen, welche die Alzheimer-Erkrankungen auslösen, liegen in oder um die A β -Region herum (Abb. 4). Dabei wird zwischen Mutationen im N-terminalen Bereich, im mittleren Bereich der A β -Region und im Bereich der γ -Sekretase-Schnittstellen unterschieden. Mutationen in der Nähe der BACE1-Schnittstelle verändern die absoluten A β -Mengen. So erhöhen die »schwedische« APP-Mutation (APP^{sw}, KM670/671NL, APP₇₇₀-Nummerierung), die direkt vor der Spaltstelle liegt, und die A2V-Mutation (A β -Nummerierung, bzw. A673V bei APP₇₇₀-Nummerierung) die A β -Menge, indem sie ein besseres BACE1-Substrat erzeugen (Citron *et al.* 1992, Mullan *et al.* 1992, Haass *et al.* 1995, Di Fede *et al.* 2009, Kimura *et al.* 2016). Die protektive »isländische« A2T-Mutation hingegen verringert das Risiko zu erkranken, indem sie die A β -Produktion drastisch reduziert (Jonsson *et al.* 2012, Benilova *et al.* 2014). Beide Mutationen an Position 2 (A2T, A2V) verändern zusätzlich die Aggregationseigenschaften der Peptide (Murray *et al.* 2016). Die A2V-Mutation nimmt eine Sonderstellung unter den FAD-Mutanten ein, da sie als einzige die Krankheit nur bei homozygoten Trägern auslöst, während sie im heterozygoten Fall sogar protektiv zu wirken scheint (Di Fede *et al.* 2012). Sie verändert die Aggregationseigenschaften der Peptide so, dass sie schneller oligomerisieren, wenn nur mutiertes A β vorliegt, während die Aggregation der nicht-mutierten A β -Peptide in heterozygoten Patienten gehemmt wird (Di Fede *et al.* 2012, Messa *et al.* 2014). Darüber hinaus verschiebt die A2V-Mutation die Spaltstelle der γ -Sekretase (Kimura *et al.* 2016). Daher könnte die verstärkte Nutzung der alternativen β' -Spaltstelle (Abb. 4) und die daraus resultierende Produktion von A β_{11-x} möglicherweise einen zusätzlichen Wirkmechanismus dieser Mutante darstellen.

Die Mutationen im mittleren Bereich der A β -Sequenz verändern ebenfalls die Aggregationseigenschaften der entstehenden Peptide und erhöhen damit die Mengen an potenziell toxischeren A β -Oligomeren und -Fibrillen (Nilsberth *et al.* 2001, Hori *et al.* 2007, Selkoe & Hardy 2016, Hatami *et al.* 2017). Die um die γ - und ζ -Schnittstellen gelegenen Mutationen verändern die Prozessierung der Peptide durch die γ -Sekretase, primär durch verstärkte Nutzung der A β_{42} -Produktlinie, und resultieren in relativ verringerten A β_{40} -Mengen, sowie erhöhten relativen Mengen des stärker aggregierenden und neurotoxischen A β_{42} (Iwatsubo *et al.*

1994, Tamaoka *et al.* 1994, Weggen & Behr 2012).

Neben Mutationen spielt auch die absolute Menge an APP eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung. Duplikationen des für APP kodierenden Gens oder des ganzen Chromosoms 21, auf dem das Gen liegt, können die Krankheit auslösen, sodass bei älteren Down-Syndrom-Patienten Alzheimer-ähnliche Symptome und Amyloid-Pathologie auftreten (Lai & Williams 1989, Lemere *et al.* 1996, Rovelet-Lecrux *et al.* 2006). Alle APP-FAD-Mutationen führen also entweder zu mehr A β , zu stärker aggregierenden Peptiden oder zu mehr A β ₄₂, das ebenfalls schneller aggregiert. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Funktion von A β in der Pathogenese von Alzheimer.

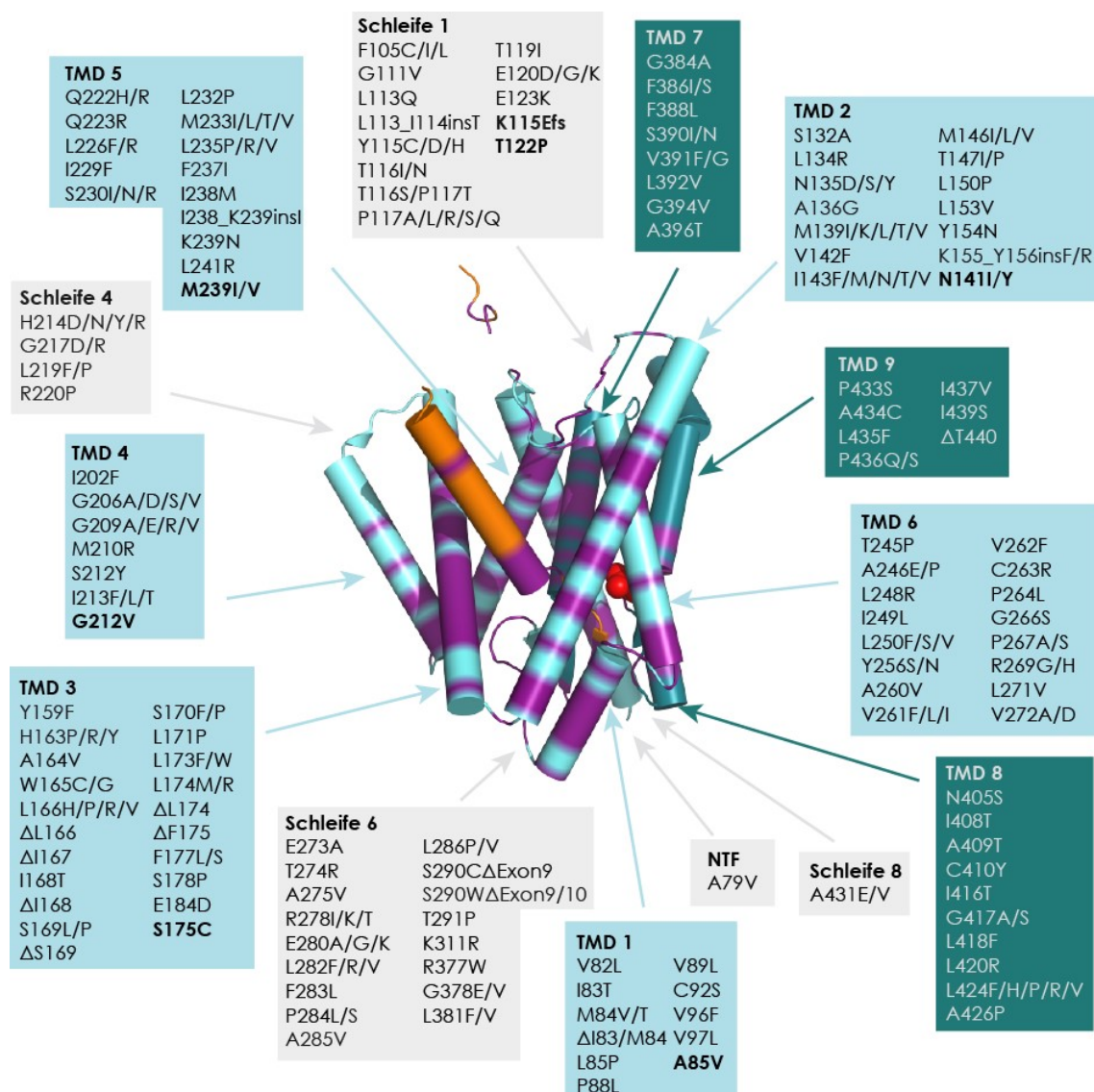


Abbildung 10: Übersicht der Präsenilin-FAD-Mutanten

Übersicht über die bisher bekannten FAD-Mutanten in beiden Präsenilinen. Die Positionen der FAD-Mutationen in Präsenilin-NTF (hellblau), -CTF (grünblau) und APP (orange) sind violett hervorgehoben. Die Präsenilin-Mutationen in den verschiedenen Schleifen und TMDs sind in den Kästen benannt. PS2 Mutationen sind dabei in Fettdruck dargestellt. Eine Übersicht der APP-Mutanten findet sich in Abb. 4.

1.4.2 Auswirkung der Präsenilin-FAD-Mutationen

Mutationen in den beiden Präsenilinen, insbesondere in PS1, sind die häufigste Ursache von FAD (Alzforum Mutations Database, Levy-Lahad *et al.* 1995, Rogaev *et al.* 1995, Sherrington *et al.* 1995). Die über 200 Mutationen sind über das ganze Protein verteilt und betreffen etwa 25 % aller Aminosäuren (Abb. 10). PS1-Mutationen sind weit häufiger als jene in PS2 und führen in der Regel zu einem früheren Start der Krankheit. Mutiertes Präsenilin produziert verstärkt längere A β -Spezies, wie A β_{42} , was zu einem erhöhten A β_{42} /A β_{40} -Verhältnis führt (Abb. 11) (Borchelt *et al.* 1996, Scheuner *et al.* 1996, Citron *et al.* 1997). Neben der veränderten Sekretion könnten auch erhöhte Mengen an intrazellulär akkumuliertem A β zur Entstehung der Krankheit beitragen (Sannerud *et al.* 2016). Einige Mutationen verringern die Gesamtaktivität, also die ϵ -Spaltung, der Protease. Dabei korreliert die Reduktion allerdings nicht mit der Erhöhung des A β_{42} /A β_{40} -Verhältnisses, sodass beide Effekte vermutlich unabhängig voneinander verursacht werden (Moehlmann *et al.* 2002, Quintero-Monzon *et al.* 2011). Bei Experimenten mit Gehirnextrakten von FAD-Patienten konnte das erhöhte A β_{42} /A β_{40} -Verhältnis reproduziert werden, nicht jedoch die reduzierte ϵ -Spaltung (Szaruga *et al.* 2015). Das in den heterozygoten Patienten immer noch exprimierte WT-Allel des PS1 und die beiden PS2-Allele scheinen also die reduzierte Gesamtaktivität ausgleichen zu können. Zudem wird die ϵ -Spaltung nicht durch alle Präsenilin-FAD-Mutationen reduziert, sodass dieser Effekt *in vivo* vermutlich nicht die Ursache der veränderten A β -Produktion ist (Chavez-Gutierrez *et al.* 2012, Szaruga *et al.* 2015). Einige dieser Mutationen verschieben, ähnlich den FAD-Mutationen in APP, die Wahl der Produktlinie in Richtung der A β_{42} -Linie und erhöhen so die Mengen an A β_{42} relativ zu A β_{40} (Sato *et al.* 2003,

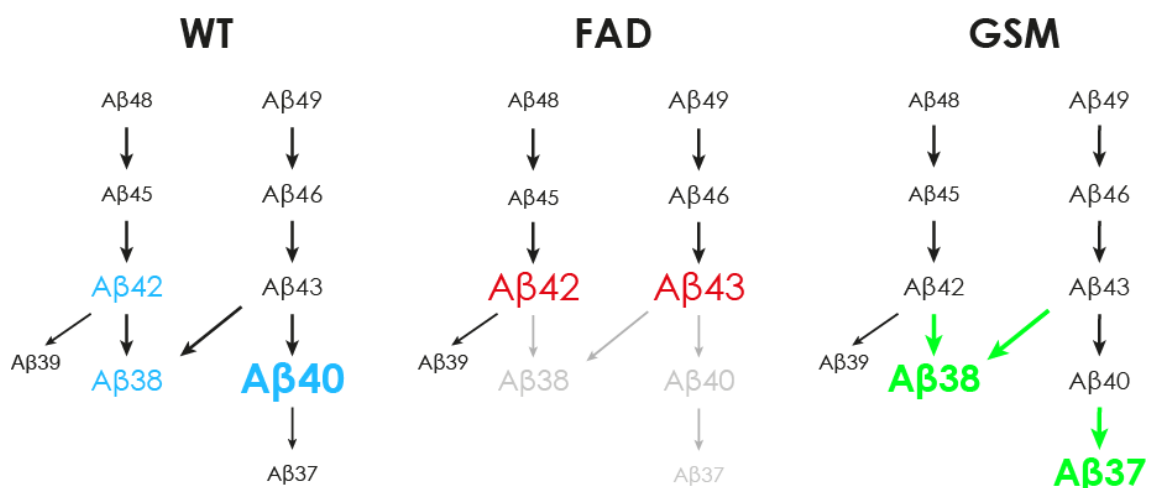


Abbildung 11: Schematische Darstellung der veränderten A β -Produktion bei FAD und GSM-Behandlung

Im physiologischen Fall (WT) ist die A β_{40} -Produktlinie die Hauptlinie und erzeugt vor allem A β_{40} . Die weniger genutzte A β_{42} -Linie führt zur Produktion von A β_{42} und A β_{38} . Im Fall von FAD-Mutationen besitzt die γ -Sekretase eine verringerte Prozessivität, was zu einer verfrühten Dissoziation längerer A β -Spezies, und damit zur erhöhten Produktion von A β_{42} und A β_{43} führt. GSMs steigern die Prozessivität der γ -Sekretase und sorgen dadurch dafür, dass vermehrt die kurzen A β_{37} - und A β_{38} -Spezies sekretiert werden.

Chavez-Gutierrez *et al.* 2012). Die Hauptursache der Produktion längerer Spezies ist eine verringerte Prozessivität der sequenziellen Spaltung. Dabei wird vor allem die γ -Spaltung von A β ₄₂ zu A β ₃₈ sowie die von A β ₄₃ zu A β ₄₀ und A β ₃₈ beeinträchtigt (Chavez-Gutierrez *et al.* 2012, Okochi *et al.* 2013, Fernandez *et al.* 2014, Szaruga *et al.* 2015). Eine verringerte Stabilität der Bindung von A β _{42/43} an Präsenilin könnte dabei zu einer erhöhten Dissoziation der längeren Spezies von der Protease führen (Okochi *et al.* 2013, Szaruga *et al.* 2017). FAD-Mutationen verändern die Konformation des aktiven Zentrums und reduzieren dabei die Bindung und Aktivität von γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs) sowie, in einigen Fällen, die Bindung des Substrats (Xia *et al.* 2000, Ikeuchi *et al.* 2003, Czirr *et al.* 2007, Chau *et al.* 2012, Fukumori & Steiner 2016). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass FAD-Mutationen zumindest lokal die Konformation der γ -Sekretase verändern und damit die Positionierung, bzw. die lokale Bindung, und die Spaltung des Substrats so beeinflussen, dass es nicht normal prozessiert wird und längere A β -Spezies produziert werden.

1.5 Die Amyloid-Hypothese

Die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung ist noch nicht im Detail erforscht. Die momentan weitestgehend akzeptierte Theorie ist die Amyloid-Hypothese (AH) (Abb. 12), oder Amyloid-kaskaden-Hypothese, die erstmals Anfang der 1990er Jahre formuliert wurde (Hardy & Higgins 1992, Selkoe & Hardy 2016). Sie besagt, dass erhöhte A β -Mengen und/oder längere A β -Spezies die primären Ursachen der Krankheit sind. Die vermehrt entstehenden toxischen A β -Spezies induzieren synaptische Fehlfunktionen und lösen auf noch unbekannte Weise die pathologische Phosphorylierung und Aggregation von Tau aus. Daraus resultiert eine großflächige Degeneration von Synapsen und Neuronen, was erst zu kognitiven Problemen und letztendlich zur Demenz führt.

Die AH basiert darauf, dass die genetischen Ursachen sowie die bekannten Risikofaktoren der Krankheit mit einem veränderten A β -Metabolismus, vor allem erhöhten Mengen der längeren

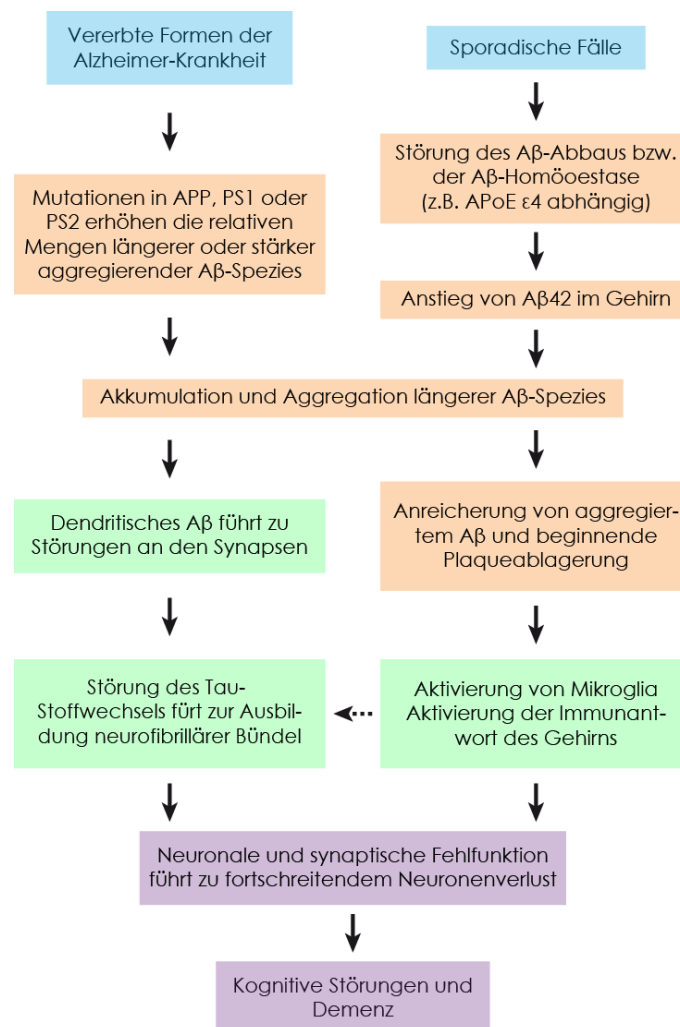


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Amyloid-Hypothese

In beiden Krankheitsformen führt ein veränderter A β -Metabolismus zur A β -Akkumulation und –Aggregation (beige). Dies verursacht verschiedene zelluläre Reaktionen (grün), die letztlich zu Neurodegeneration und Demenz (violett) führen.

und neurotoxischen A β -Spezies, verknüpft sind (Jarrett *et al.* 1993, Mucke *et al.* 2000, Saito *et al.* 2011, Selkoe & Hardy 2016). Das Verhältnis zwischen längeren und kürzeren Spezies scheint entscheidend für die Toxizität sowie die Pathogenese zu sein und korreliert in verschiedenen FAD-Fällen mit dem Alter bei Krankheitsbeginn (Kuperstein *et al.* 2010, Tang & Kepp 2018). Die Identität der tatsächlich toxischen A β -Form wird immer noch diskutiert. Vermutlich sind aber lösliche, oligomerisierte A β -Formen die entscheidende Spezies (Shankar *et al.* 2008, Koffie *et al.* 2009, Esparza *et al.* 2013). Erhöhte Mengen an A β -Oligomeren könnten die Synapsenfunktion stören und in der Folge zu kognitiven Defiziten führen. Im Laufe der Krankheit wird die Störung der Synapsen durch A β dadurch verstärkt, dass A β zusätzlich die pathologische Hyperphosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins auslösen kann. Dies kann den Verlust dessen mikrotubulärer Funktion induzieren, was letztlich zur Degeneration der Synapsen führt (Busciglio *et al.* 1995, Zempel *et al.* 2013, Spires-Jones & Hyman 2014, Pooler *et al.* 2015).

Doppelt transgene Mäuse, die sowohl humanes APP als auch humanes Tau überexprimieren, zeigen im Vergleich zu einfach transgenen Tieren verstärkte Tau-Pathologie, jedoch unveränderte A β -Pathologie (Lewis *et al.* 2001). Dies zeigt, dass A β in der Lage ist die Tau-Pathologie zu induzieren oder zu verstärken und deshalb in der Krankheitsentwicklung wohl der Deregelation von Tau vorgelagert ist (Pooler *et al.* 2015, Spires-Jones *et al.* 2017). Da eine Reduktion von Tau die A β -induzierte Neurotoxizität verhindern oder hemmen kann, sind für die Entstehung der Krankheit jedoch beide Proteine notwendig (Rapoport *et al.* 2002, Roberson *et al.* 2007, Jin *et al.* 2011, Roberson *et al.* 2011). Im späteren Verlauf aggregiert immer mehr A β , bildet Fibrillen und später Plaques. Diese A β -Ablagerungen führen zur Aktivierung von Mikroglia, wobei deren chronische Stimulation zu einer Überaktivierung und damit einer starken Entzündungsantwort des Gehirns führt, was über einen längeren Zeitpunkt hinweg eine weitere Schädigung der Synapsen und Neuronen verursacht (Henstridge *et al.* 2019, Long & Holtzman 2019). Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht verstanden.

Die AH kann sowohl auf die Entstehung von FAD als auch auf die nicht vererbten sAD-Fälle angewendet werden. Beide Krankheitsformen sind neuropathologisch nicht zu unterscheiden (Nochlin *et al.* 1993, Lippa *et al.* 1996). FAD-Patienten produzieren deutlich mehr der toxischen A β -Spezies als sAD-Patienten und erkranken viel früher, teilweise bereits in ihren 20ern, die Krankheit verläuft dabei aber nicht unbedingt schneller (Holmes & Lovestone 2002, Moehlmann *et al.* 2002, Godbolt *et al.* 2004, Snider *et al.* 2005). Die Menge der toxischen A β -Spezies scheint also vor allem der Auslöser und damit bedeutend für den Beginn der Krankheit zu sein, aber gleichzeitig weniger Einfluss auf den Verlauf der Krankheit zu haben. ApoE ϵ 4 wirkt in beiden Fällen ähnlich und verschiebt den Beginn der Krankheit, sowohl bei FAD als auch bei sAD, nach

vorne (Corder *et al.* 1993, Pastor *et al.* 2003). Obwohl sAD-Patienten nur Wildtyp (WT) Präsenilin besitzen, konnte in einigen Fällen, wie bei FAD-Mutationen, eine verringerte Prozessivität der γ -Sekretase mit einhergehender Produktion längerer A β -Spezies gezeigt werden (Szaruga *et al.* 2015). Zusätzlich konnte in sAD-Fällen sowohl ein verringerter A β -Abbau als auch eine erhöhte BACE1-Aktivität nachgewiesen werden (Yang *et al.* 2003, Mawuenyega *et al.* 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein gestörter A β -Metabolismus auch bei sAD von großer Bedeutung ist. Beide Krankheitsformen unterscheiden sich also im zeitlichen Auftreten und dem Einfluss spezieller Prozesse. Der physiologische Auslöser, nämlich eine veränderte A β -Homöostase, scheint sich allerdings in beiden Fällen nicht zu unterscheiden.

Der in der Amyloid-Hypothese vorausgesagte zeitliche Ablauf wird durch die longitudinalen Veränderungen verschiedener Biomarker im Gehirnliquor (CSF, engl. *cerebrospinal fluid*) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) basierte Bilddaten unterstützt. FAD-Patienten zeigen bereits 20-25 Jahre vor den Symptomen reduzierte A β_{42} -Spiegel im CSF, sowie aufkommende A β -Ablagerungen in PET-Analysen (Bateman *et al.* 2012). Erhöhte Tau- und phospho-Tau-Spiegel sind erst später, etwa 15 Jahre vor Krankheitsbeginn, im CSF nachweisbar. sTREM2, ein Marker für mikrogliale Aktivität, steigt etwa fünf Jahre vorher an und zeigt damit die Reaktion des Immunsystems im Gehirn (Suarez-Calvet *et al.* 2016a). Untersuchungen des CSF von sAD-Patienten zeigen dabei ähnliche Dynamiken der einzelnen Biomarker (Villemagne *et al.* 2013, Suarez-Calvet *et al.* 2016b).

Obwohl viele Daten die AH stützen, konnte sie bisher nicht final bewiesen werden. Dies hat dazu geführt, dass vermehrt alternative Theorien diskutiert werden. Eine dieser Theorien, die Präsenilin-Hypothese (PH), basiert auf dem neurodegenerativen Phänotyp der PS1-KO-Mäuse und darauf, dass einige FAD-Mutationen im Präsenilin eine verringerte Gesamtaktivität haben (Shen *et al.* 1997, Shen & Kelleher 2007). Diese verminderte Aktivität könnte zur Hemmung physiologisch wichtiger Signalwege und zur Akkumulation von Substraten führen, was folglich Neurodegeneration auslösen könnte. Die PH wird unter anderem durch die Entdeckung zweier PS1-FAD-Mutationen, L435F und C410Y, gestützt. Diese lösen die Krankheit aus, obwohl sie eine stark eingeschränkte Aktivität aufweisen und so nur sehr wenig A β sekretieren (Heilig *et al.* 2010, Heilig *et al.* 2013). Demzufolge würde der Verlust von γ -Sekretaseaktivität und nicht das erhöhte A $\beta_{42/40}$ -Verhältnis die Krankheit auslösen (Shen & Kelleher 2007, Watanabe & Shen 2017). Dieser Widerspruch zur AH führt zu der therapeutisch wichtigen Frage, ob die γ -Sekretase aktiviert werden muss oder ob, wie durch die AH postuliert, die Produktion längerer A β -Spezies verhindert werden muss.

Zusätzlich gibt es weitere Theorien, die das Altern als wichtigsten Risikofaktor der Krankheit in den Mittelpunkt stellen. So stellen sie z.B. die Hypothese auf, dass reduzierte

Mitochondrienfunktion im Alter oder über das gesamte Leben akkumulierte DNA-Schäden in Neuronen die Krankheit auslösen. Weitere Theorien sehen die Ursache der Krankheit in beeinträchtigtem Glukosemetabolismus oder Schäden im vaskulären System des Gehirns (Karran & De Strooper 2016). Obwohl unklar ist ob diese Effekte die Krankheit tatsächlich auslösen können, scheinen sie die Entstehung der Krankheit zu beeinflussen. So können einige dieser Effekte, wie beispielsweise die Wechselwirkung mit Gliazellen, der veränderte Metabolismus im Alter oder A β -unabhängige Veränderungen im Tau-Metabolismus, teilweise in eine umfassende erweiterte Amyloid-Hypothese implementiert werden und sind wichtige Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer, A β -unabhängiger, Medikamente (Karran & De Strooper 2016, Long & Holtzman 2019).

1.6 Pharmakologische Strategien gegen die Alzheimer-Erkrankung

1.6.1 A β -Immuntherapien und Sekretaseinhibitoren

Bis heute gibt es kein wirksames Medikament gegen die Alzheimer-Erkrankung, sondern lediglich wenige, symptomatische Medikamente, wie z.B. Cholinesteraseinhibitoren oder den NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin (Long & Holtzman 2019, Panza *et al.* 2019). Wissenschaft und Industrie stehen daher unter großem Druck, geeignete Medikamente zu entwickeln und auf den Markt zu bringen. Die AH definiert A β als primäres Zielmolekül für mögliche Therapien, etwa durch dessen beschleunigten Abbau oder verringerte Produktion. Schon Ende der 1990er Jahre wurde daher eine Immuntherapie gegen A β vorgeschlagen (Schenk *et al.* 1999). Erste aktive Immunisierungen mit vor-aggregiertem A β_{42} (AN-1792) konnten die A β -Ablagerung in Alzheimer-Patienten reduzieren, erzeugten aber keine oder nur geringe kognitive Verbesserung, jedoch teilweise starken Nebenwirkungen, weshalb sie eingestellt wurden (Gilman *et al.* 2005, Holmes *et al.* 2008, Vellas *et al.* 2009, Jakel *et al.* 2019, Nicoll *et al.* 2019). Heutige Studien nutzen passive Immunisierung durch biotechnologisch hergestellte anti-A β -Antikörper (Arndt *et al.* 2018, Panza *et al.* 2019). Erste Studien mit Antikörpern wie Aducanumab oder Gantenerumab reduzierten die A β -Ablagerung in Patienten (Sevigny *et al.* 2016, Ostrowitzki *et al.* 2017). Die Gantenerumab-Studie wurde jedoch aufgrund fehlender kognitiver Effekte abgebrochen (Ostrowitzki *et al.* 2017). In einer Phase-Ib-Studie reduzierte Aducanumab die fortschreitende Verschlechterung der Symptome dosisabhängig (Sevigny *et al.* 2016). Diese Reduktion erzielte aber aufgrund der kleinen Studiengröße und der geringen Effektgröße keine statistische Signifikanz. Zwei spätere Phase-III-Studien mit Patienten im Anfangsstadium der Alzheimer-Erkrankung wurden kürzlich nach einer Zwischenanalyse abgebrochen, da sie ihre primären Endpunkte vermutlich nicht erreichen könnten (Biogen 2019b). Darauf folgende Analysen größerer Datensätze zeigten allerdings, dass Aducanumab vor allem in der höchsten eingesetzten Dosis in der Lage war, die Tau- und Amyloidmengen zu reduzieren (Biogen 2019a). In einer der beiden Studien wurde die Verschlechterung der Symptome signifikant verlangsamt. Diese Studie belegt damit zum ersten Mal einen positiven Effekt eines gegen A β gerichteten Medikaments in Patienten mit beginnender Alzheimer-Erkrankung. Da die Studie allerdings abgebrochen wurde und diese Ergebnisse erst in nachgeschalteten Analysen erkannt wurden, müssen weitere Studien abgewartet werden, um die AH und die Wirksamkeit von anti-A β -Medikamenten zu beweisen.

Anders als bei Immunisierungsversuchen, bei denen versucht wird den Abbau von A β zu

erhöhen, wird in alternativen Ansätzen versucht, durch Hemmung der β - und γ -Sekretase die A β -Produktion zu reduzieren. Beide Proteasen schneiden neben APP noch weitere Substrate, sodass eine umfassende Hemmung dieser zu Nebenwirkungen führen könnte (Haapasalo & Kovacs 2011, Vassar *et al.* 2014). Einige β -Sekretaseinhibitoren wurden schon im Menschen getestet und senkten die A β -Menge im CSF deutlich, verfehlten aber positive kognitive Effekte oder führten sogar zu einer Verschlechterung (Egan *et al.* 2018, Eli Lilly *et al.* 2018, Egan *et al.* 2019, Henley *et al.* 2019). Die kognitiven Nebenwirkungen waren nicht unerwartet, da schon Langzeitversuche mit Mäusen zeigen konnten, dass längere BACE1-Inhibition die Bildung und Dichte der dendritischen Dornen sowie die hippocampale Langzeitpotenzierung verringert (Filser *et al.* 2015, Zhu *et al.* 2018). Neuere, verbesserte Inhibitoren wie CNP520 oder Elenbecestat wurden in weiteren Studien getestet, kürzlich aber alle aufgrund von Nebenwirkungen und verschlechterter kognitiver Funktionen abgebrochen (Lopez Lopez *et al.* 2017, Long & Holtzman 2019).

GSIs wurden schon früh in transgenen Mäusen und anderen Modellsystemen getestet. In Mäusen konnten sie die A β -Produktion deutlich verringern (Dovey *et al.* 2001, Lanz *et al.* 2003). Bei längerer Behandlung verursachten sie jedoch teils starke Nebenwirkungen, die durch eine Hemmung des Notch-Signalweges erklärt werden konnten. So erzeugten GSIs in Zebrafischen und *Drosophila* starke Entwicklungsdefekte und/oder Störungen der Neurogenese (Geling *et al.* 2002, Micchelli *et al.* 2003). Zusätzlich zeigten Zellkulturexperimente mit fetalem Thymusgewebe eine starke Beeinträchtigung der T-Zelldifferenzierung (Doerfler *et al.* 2001, Hadland *et al.* 2001). Dieser Effekt konnte in Mäusen bestätigt werden (Wong *et al.* 2004). Die behandelten Mäuse wiesen zusätzlich noch eine gestörte Differenzierung der Darmzellen auf (Wong *et al.* 2004). Diese Differenzierungsprozesse laufen im erwachsenen Menschen immer noch ab, sodass diese präklinischen Experimente Nebenwirkungen im Menschen nahelegen. Trotz dieser Gefahr von Nebenwirkungen wurden GSIs im Menschen getestet. Erste Studien mit dem allosterischen GSI Semagacestat zeigten deutlich verringerte A β -Spiegel im Plasma (Fleisher *et al.* 2008). Eine Phase-III-Studie wurde jedoch aufgrund zu starker und vermutlich Notch-assoziierter Nebenwirkungen, wie gastrointestinalen Problemen und Hautkrebs, abgebrochen (Doody *et al.* 2013). Hohe Dosen des Inhibitors verschlechterten den kognitiven Status sogar. Grund hierfür könnte die Hemmung des Notch-Signalweges sein, wobei alternativ auch die Toxizität akkumulierender Substrate wie den APP-CTFs diskutiert wurde (Mitani *et al.* 2012, Doody *et al.* 2013). Eine spätere Studie zeigte, dass Semagacestat in Wirklichkeit ein Pseudoinhibitor der γ -Sekretase ist. Er hemmt zwar die Sekretion von A β , zeitgleich erhöhen sich aber die Mengen der kurzen Nebenprodukte der γ -Spaltung. Daher wird angenommen, dass Semagacestat nur die Freisetzung der Spaltprodukte aus der Membran hemmt, nicht jedoch die primäre ϵ -Spaltung.

Dies führt zur Akkumulation der längeren A β -Spezies und der im Zuge der ζ - und γ -Spaltung erzeugten kurzen Peptide in der Zelle. Diese Akkumulation der Neben- und Zwischenprodukte könnte die verschlechterte Kognition bei Semagacestat und anderen allosterischen Inhibitoren erklären (Tagami *et al.* 2017). Um die Nebenwirkungen durch die Hemmung des Notch-Signalweges zu umgehen, wurden sogenannte Notch-aussparende Inhibitoren entwickelt, die eine höhere Affinität zu APP als zu Notch1 haben. Der Inhibitor Avagacestat sollte die Notch1-Spaltung nicht inhibieren, führte aber zu ähnlichen klinischen Ergebnissen wie Semagacestat (Coric *et al.* 2012, Albright *et al.* 2013). Andere Studien zeigten zudem, dass im Zuge der Charakterisierung die Selektivität für APP gegenüber Notch-1 überschätzt wurde und in Wirklichkeit zu niedrig war, um die Hemmung der APP-Spaltung zu favorisieren (Crump *et al.* 2012).

Da bisher viele Versuche, das Voranschreiten der Alzheimer-Erkrankung durch die Reduktion von A β zu verlangsamen, scheiterten, stellt sich die Frage, ob dies die richtige Strategie darstellt. Kann eine Reduktion der A β -Mengen oder A β -Pathologie zu einem Zeitpunkt, an dem schon Symptome auftreten bzw. schon sehr viele Neuronen degeneriert sind, überhaupt eine verbesserte Kognition oder zumindest einen reduzierten Verfall bewirken? Falls A β nur ein früher Faktor der Krankheit ist, der nachfolgende pathologische Prozesse, wie z.B. Tau-Toxizität oder eine gestörte Immunantwort des Gehirns, auslöst oder verstärkt, dann müsste A β sehr früh, viele Jahre vor Ausbruch der Symptome, reduziert werden. Die Ergebnisse der abgebrochenen Aducanumab-Studien weisen darauf hin, dass anti-A β -Medikamente in einem frühen Stadium der Krankheit deren Voranschreiten verlangsamen können. Derzeit laufen einige Studien mit FAD- bzw. ApoE ϵ 4-Patienten, die deutlich vor vorhergesagtem Krankheitsbeginn behandelt werden können (Long & Holtzman 2019). Dadurch soll geklärt werden, ob eine frühzeitige Behandlung stärkere Effekte der Medikamente hervorrufen kann. Da die bisher getesteten Medikamente jedoch, wenn überhaupt, nur geringe positive Effekte hatten, werden in Zukunft verbesserte Wirkstoffe oder auch neue Zielmoleküle benötigt. Alternative Ansätze könnten dabei Tau-Immunisierungsstudien oder die Modulation der mikroglialen Immunantwort sein (Marsh *et al.* 2016, Congdon & Sigurdsson 2018). Alle bisherigen Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass die pathologischen Prozesse lange vor den Symptomen einsetzen und die bisherigen Ansätze nur darauf zielen können die Krankheit zu verzögern, oder zumindest zu verlangsamen, nicht aber bereits erkrankte Patienten wirksam zu therapieren. Die Medikation müsste also schon in jungen Jahren starten und dann lange, fast das ganze Leben, fortgeführt werden. Diese Problematik macht die Erforschung neuer, potenter und vor allem sicherer Wirkstoffklassen notwendig.

1.6.2 Entdeckung und Eigenschaften von γ -Sekretasemodulatoren

Ein Beispiel für alternative Wirkstoffe, mit potenziell weniger Nebenwirkungen als die klassischen Sekretaseinhibitoren, sind die sogenannten γ -Sekretasemodulatoren (GSMs). Die ersten beschriebenen GSMs waren bestimmte NSAIDs (nichtsteroidale Antirheumatika, engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*), wie Ibuprofen oder Sulindac-Sulfid (Weggen *et al.* 2001). Sie senken die Sekretion des potenziell toxischen $A\beta_{42}$ und erhöhen die des nicht-toxischen, kürzeren $A\beta_{38}$, wobei die $A\beta$ -Gesamtmenge nicht verändert wird (Weggen *et al.* 2001). Dieser Effekt ist unabhängig von der Inhibition der Cyclooxygenase (COX), dem primären Zielprotein der NSAIDs (Weggen *et al.* 2001). R-Flurbiprofen (Tarenfurbil) wurde als erster GSM klinisch getestet, zeigte aber trotz positiver Hinweise in der Phase-II-Studie keine positiven Effekte in der folgenden Phase-III-Studie (Eriksen *et al.* 2003, Galasko *et al.* 2007, Kukar *et al.* 2007, Wilcock *et al.* 2008, Green *et al.* 2009). Die mangelnde Effektivität könnte aus der geringen Wirksamkeit des Wirkstoffes und dessen schlechter Aufnahme in das Gehirn resultieren (Imbimbo 2009). In der Folge wurde eine neue Generation NSAID-Derivate mit einer höheren Wirksamkeit und niedrigeren IC_{50} -Werten entwickelt, die sogenannten sauren GSMs, wie z.B. GSM-1 (Abb. 13) (Page *et al.* 2008) oder EVP-0015962 (Rogers *et al.* 2012). Wie ihre Vorgänger verringern diese Substanzen die Produktion von $A\beta_{42}$ und erhöhen gleichzeitig die von $A\beta_{38}$, ohne dabei die Menge der erzeugten ICDs zu verringern (Crump *et al.* 2013, Bursavich *et al.* 2016). Die Behandlung transgener Mäuse mit EVP-0015962 oder GSM-1 reduzierte die $A\beta$ -Pathologie und,

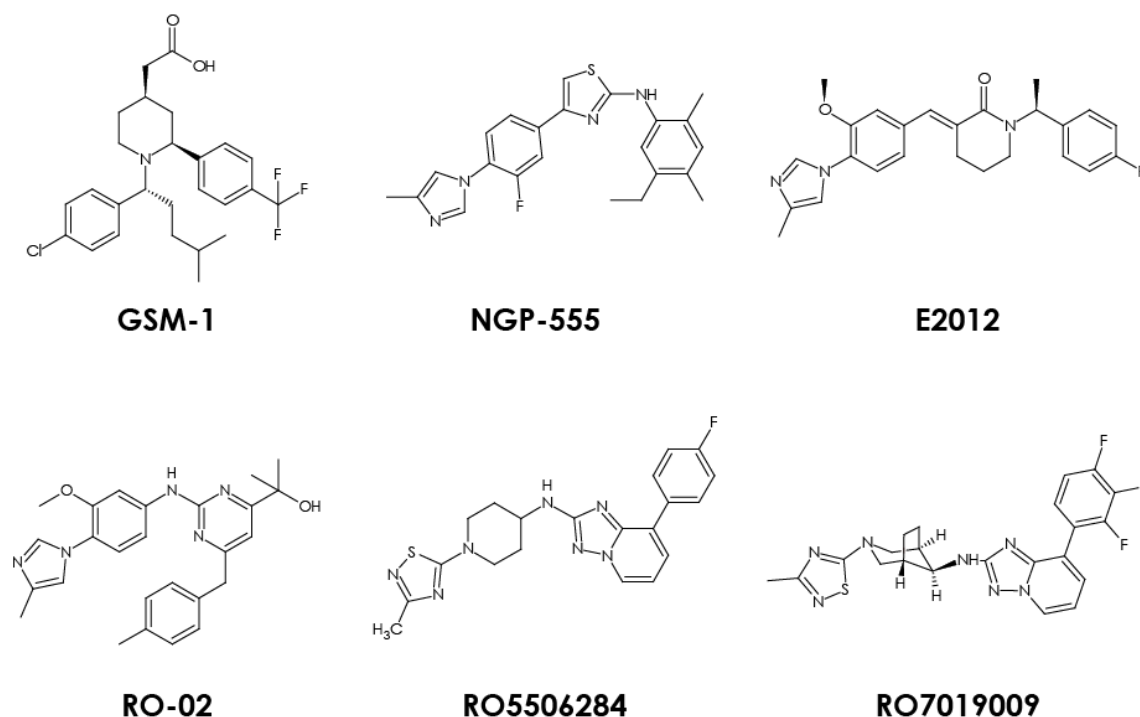


Abbildung 13: Strukturformeln ausgewählter γ -Sekretasemodulatoren

Der exemplarische, saure GSM GSM-1 sowie die heterozyklischen GSMs NGP-555, E2012 und RO-02 und die in dieser Arbeit vorgestellten GSMs RO5506284 und RO7019009.

im Fall von EVP-0015962, die kognitiven Phänotypen (Page *et al.* 2008, Rogers *et al.* 2012).

Die zweite Klasse der neueren Generation der GSMs bilden die parallel entwickelten heterozyklischen GSMs, die aus verknüpften aromatischen Ringen zusammengesetzt sind. Anders als die sauren GSMs reduzieren sie nicht nur die Produktion von A β ₄₂, sondern auch die von A β ₄₀, wobei sie zusätzlich zur A β ₃₈-Produktion auch die von A β ₃₇ erhöhen (Crump *et al.* 2013). Einige von ihnen haben eine verbesserte Bioaktivität und gelangen besser in das Gehirn (Wagner *et al.* 2014). Ausgehend von einfacheren Strukturen wurde die Variabilität durch Veränderungen, z.B. der Heterozyklen oder Substituenten, in den letzten Jahren massiv erhöht, was zu einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen geführt hat (Crump *et al.* 2013, Bursavich *et al.* 2016).

Die wichtigste Klasse heterozyklischer GSMs sind die Aryl- oder Phenylimidazole, wie z.B. NGP-555 (NeuroGenetics, Abb. 13) (Kounnas *et al.* 2010). *In vitro* verschiebt NGP-555 die Produktion hin zu den kurzen A β _{37/38}-Spezies, ohne die ICDs anderer Substrate zu beeinflussen. *In vivo* konnte in transgenen Mäusen eine reduzierte A β -Pathologie nachgewiesen werden (Kounnas *et al.* 2010). Neuere, leicht modifizierte GSMs wie E2012 (Abb. 13) von Eisai haben ähnliche *in vitro* und *in vivo* Effekte auf die A β -Spezies (Portelius *et al.* 2010, Borgegard *et al.* 2012, Cai *et al.* 2017). Klinische Studien mussten wegen Nebenwirkungen abgebrochen werden, wurden später aber mit einem verbesserten Nachfolger wiederaufgenommen (Yu *et al.* 2014, Bursavich *et al.* 2016). Aminopyrimidin-GSMs, wie RO-02 (Abb. 13) von Roche, sind eine weitere Variation und modulieren ebenfalls beide Produktlinien (A β ₄₀/A β ₄₂) ohne die Gesamtaktivität zu inhibieren (Ebke *et al.* 2011).

Da die beiden GSM-Klassen ähnliche Strukturen aufweisen, haben sie auch ähnliche Probleme. Die aromatischen Ringe und die meist planare, sehr lipophile Grundstruktur machen die meisten dieser Substanzen hepatotoxisch, was zu Problemen bei klinischen Studien führen kann (Lovering *et al.* 2009, Gijssen & Mercken 2012, Bursavich *et al.* 2016). Durch den lipophilen Charakter und das hohe Molekulargewicht werden viele GSMs nicht ausreichend gut ins Gehirn aufgenommen, was zu einer sehr niedrigen freien Konzentration der aktiven Substanzen im Gehirn führt, und so die mögliche Wirkung limitiert (Bursavich *et al.* 2016). Eine Alternative sind GSMs aus natürlichen Quellen, wie Ginseng oder Triterpen-Glykoside aus der Trauben-Silberkerze (Oehlich *et al.* 2011, Findeis *et al.* 2012). Diese natürlichen Stoffe werden allerdings schnell abgebaut und erreichen nur niedrige Konzentrationen im Gehirn. Satori optimierte die Triterpen-Glykoside für eine erhöhte Stabilität, musste die Entwicklung aber aufgrund von Nebenwirkungen einstellen (Fuller *et al.* 2012, Loureiro *et al.* 2013, Bursavich *et al.* 2016).

Obwohl in den letzten Jahren durch die Variation von Heterozyklen, Substituenten oder durch neue Molekülklassen die Effizienz der GSMs deutlich erhöht werden konnte, stellt insbesondere

die Lebertoxizität weiterhin das Hauptproblem dieser Substanzen dar. Es sind daher noch weitere Entwicklung von neuen GSMs und neuen Klassen notwendig, um klinisch wirksame GSMs zu erhalten. Zwei dieser neuen GSMs werden im Rahmen dieser Arbeit getestet und charakterisiert.

1.6.3 Wirkmechanismus der γ -Sekretasemodulatoren

GSMs verschieben das Verhältnis der produzierten A β -Spezies hin zu kürzeren Spezies (Abb. 11), ohne dabei die für die Signaltransduktion wichtige Spaltung der Substrate, wie z.B. Notch1, zu behindern (Weggen *et al.* 2001). Da diese Inhibition der Spaltung bestimmter Substrate die Nebenwirkungen der GSI erklären könnte, stellen GSMs eine alternative und attraktive Therapiestrategie dar. Zudem wirken GSMs gezielt gegen die längeren sekretierten A β -Spezies A $\beta_{42/43}$, die im Verdacht stehen, die Alzheimer-Erkrankung auszulösen (Kuperstein *et al.* 2010). Eine Verschiebung des A $\beta_{42/40}$ -Verhältnisses hin zu A β_{40} hemmt die A β_{42} -Aggregation *in vitro* und *in vivo* und vermindert die Toxizität der Peptide und könnte gegen die Krankheit schützen (Kim *et al.* 2007, Yan & Wang 2007, Kuperstein *et al.* 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die erhöhten Mengen A β_{38} sogar gegen die A β -Toxizität schützen könnten (Moore *et al.* 2018).

Erste Studien mit den frühen NSAID-GSMs haben gezeigt, dass die Substanzen an das APP-CTF (Kukar *et al.* 2008, Botev *et al.* 2011) binden. Da andere Studien aber eine allosterische Wirkung, direkt auf die γ -Sekretase (Beher *et al.* 2004, Clarke *et al.* 2006), nahelegen, ergibt sich ein uneinheitliches Bild (Bursavich *et al.* 2016). Die GSMs der zweiten Generation, z.B. GSM-1, -5 oder der Aminopyrimidin-GSM RO-57, binden an das Präsenilin-NTF (Crump *et al.* 2011, Ebke *et al.* 2011, Ohki *et al.* 2011, Jumpertz *et al.* 2012). Die Bindung von Inhibitoren in das aktive Zentrum kann die Bindung von einigen, wenn auch nicht allen, GSMs verstärken, was zeigt, dass GSMs nicht ins aktive Zentrum binden, sondern allosterisch wirken (Pozdnyakov *et al.* 2013). Die verschiedenen GSM-Klassen scheinen dabei unterschiedliche, nur partiell überlappende Bindestellen zu besetzen (Ebke *et al.* 2011, Pozdnyakov *et al.* 2013). Die genaue Position der Bindestellen ist nicht bekannt, es konnten aber Interaktionen mit der hydrophilen Schleife 1 und der TMD1 gezeigt werden (Takeo *et al.* 2014, Cai *et al.* 2017). Vermutlich binden GSMs an die extrazelluläre Seite des Präsenilin-NTF, wobei die Bindestelle selbst durch Interaktion mit NCT und dem Substrat beeinflusst zu werden scheint, sodass die eigentliche Bindestelle vermutlich erst im fertig ausgebildeten Komplex aller γ -Sekretaseuntereinheiten und dem Substrat gebildet wird (Uemura *et al.* 2010, Petit *et al.* 2019). Zusätzlich zeigen FRET-, FLIM- und SCAM-Analysen, dass GSMs nicht nur das aktive Zentrum, sondern die Konformation des gesamten Komplexes verändern und einen Wechsel zwischen eher geöffnet oder geschlossen wirkenden Strukturen induzieren (Lleo *et al.* 2004, Uemura *et al.* 2009, Ohki *et al.* 2011). Die Bindung von GSMs verursacht also Änderungen der γ -Sekretasekonformation, welche vermutlich die Grundlage der

veränderten Spaltung der A β -Peptide bilden (Behr *et al.* 2004, Crump *et al.* 2011, Ohki *et al.* 2011, Takeo *et al.* 2014).

Die genauen Auswirkungen der Modulatoren auf den Spaltmechanismus der γ -Sekretase sind noch nicht vollständig erforscht und werden weiter untersucht. GSMs scheinen nach der initialen ϵ -Spaltung zu wirken, da sie weder die Effizienz, noch die Position des ersten Schnitts verändern (Ebke *et al.* 2011, Chavez-Gutierrez *et al.* 2012, Dimitrov *et al.* 2013). Sie verbessern die Effizienz der vierten A β -Spaltung, also der von A β_{43} bzw. A β_{42} in ihre kürzeren Produkte, vermutlich sowohl durch eine Steigerung der katalytischen Geschwindigkeit (V_{\max}) als auch durch eine reduzierte Dissoziation der längeren A β -Spezies von der Protease zwischen den Schritten der sequenziellen Spaltung (Chavez-Gutierrez *et al.* 2012, Okochi *et al.* 2013, Szaruga *et al.* 2017). Interessanterweise haben viele Präsenilin-FAD-Mutationen den gegenteiligen Effekt, da sie das A β_{42+43} /A β_{40} -Verhältnis und die Dissoziation der Zwischenprodukte steigern, also die γ -Spaltung hemmen (Okochi *et al.* 2013, Szaruga *et al.* 2015, Szaruga *et al.* 2017). Die von den GSMs veränderte γ -Sekretasekonformation könnte also die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes modulieren und damit die Prozessivität der Protease beeinflussen.

Zusammengefasst erzeugen GSMs eine veränderte Konformation der γ -Sekretase und ihres aktiven Zentrums, die eine effizientere sequenzielle γ -Spaltung ermöglicht und so die Produktion pathogener, längerer A β -Spezies verhindert, ohne dabei die Gesamtaktivität zu beeinflussen.

1.6.4 Wirksamkeit von GSMs in Modellsystemen

Seit ihrer Entdeckung wurde die Wirksamkeit von GSMs in verschiedenen Modellsystemen, meist HEK293-Zellen, analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die meisten APP-FAD-Mutanten, die zu einer erhöhten A β_{42} -Produktion führen, von modulierter γ -Sekretase in kürzere Spezies, vor allem A β_{38} , prozessiert werden (Weggen *et al.* 2003, Page *et al.* 2010). Auch im Fall vieler Präsenilin-FAD-Mutanten konnte die pathogene A β_{42} -Produktion zugunsten der kürzeren Spezies reduziert werden (Page *et al.* 2008, Hahn *et al.* 2011, Kretner *et al.* 2011). Bei einigen Mutanten aber, wie der starken PS1 L166P Mutante, konnte A β_{42} nicht, oder nur verzögert, reduziert werden, obwohl ein leichter Anstieg von A β_{38} erkennbar war (Hahn *et al.* 2011, Kretner *et al.* 2011).

Im Vergleich zu diesen klassischen Zellkulturmodellen bieten neuerdings Neuronen, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs, engl. *induced pluripotent stem cells*) differenziert werden, die Möglichkeit, FAD-Mutanten und GSMs in einem komplexeren System zu untersuchen, um so beispielsweise Rückschlüsse auf die Auswirkungen auf den Tau-Metabolismus ziehen zu können (Penney *et al.* 2019). Auch in diesen Zellen konnten GSMs APP-

und Präsenilin-FAD-Mutanten modulieren und das Verhältnis von längeren zu kürzeren A β -Spezies zugunsten der kürzeren verschieben (Koch *et al.* 2012, Liu *et al.* 2014, Moore *et al.* 2015, Kondo *et al.* 2017, Cusulin *et al.* 2019, Kwart *et al.* 2019). Zusätzlich konnten auch andere Aspekte, wie die stark reduzierte Reaktion der PS1 L166P Mutante, reproduziert werden (Koch *et al.* 2012, Kwart *et al.* 2019).

Studien mit transgenen Alzheimer-Mausmodellen, vor allem APP^{sw} exprimierenden Linien, haben gezeigt, dass mit GSMs behandelte Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Plaquedichte und -fläche aufweisen und die Menge an A β ₄₂ abnimmt (Page *et al.* 2008, Imbimbo *et al.* 2010, Kounnas *et al.* 2010, Rogers *et al.* 2012). Dabei scheint es so, dass die Anzahl der Plaques und damit die gesamte Plauefläche sinkt, die Größe der Plaques aber in etwa gleich bleibt.

In einigen Studien wurden zudem die Auswirkungen von GSMs auf die Verhaltens- und Kognitionsdefizite der Mausmodelle untersucht. Dabei konnten GSMs die kognitiven Phänotypen, wie z.B. Gedächtnisprobleme, reduzieren, wohingegen GSIs teils sogar stärkere Defizite auslösen konnten (Imbimbo *et al.* 2010, Mitani *et al.* 2012, Rogers *et al.* 2012, Sivilia *et al.* 2013).

Diese *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen, dass GSMs in verschiedenen Systemen sowohl die A β -Pathologie als auch kognitive Phänotypen verringern können und deshalb auch im Menschen eine Therapieoption sein könnten.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Alzheimer-Erkrankung ist die häufigste Ursache von Demenz und damit eine große Herausforderung für Patienten, Angehörige und das Gesundheitswesen. Trotz über zwanzigjähriger Forschung, gibt es zurzeit keine wirksame Therapie.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Ursachen der Alzheimer-Erkrankung, im Speziellen die Ursachen der familiär vererbten Form der Krankheit, besser zu verstehen und mögliche Therapien zu erproben. Dafür wurden verschiedene, vor allem A β ₄₃-produzierende, PS1-FAD-Mutationen *in vitro* untersucht. Einige dieser FAD-Mutationen haben eine sehr geringe Gesamtaktivität, wodurch sich die Frage stellte, ob diese Mutationen die Krankheit tatsächlich durch erhöhte Mengen längerer A β -Spezies oder über einen anderen Mechanismus, wie z.B. verringerte γ -Sekretaseaktivität, auslösen. Für potenzielle Therapien würde das bedeuten, dass die γ -Sekretase entweder aktiviert oder gehemmt werden müsste. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Mutationen genauer untersucht und charakterisiert, um dadurch Rückschlüsse auf ihre Rolle in der Entstehung der Krankheit ziehen zu können. Im Weiteren wurde analysiert, welche molekularen und funktionalen Auswirkungen FAD-Mutationen auf Präsenilin und die A β -Prozessierung haben. Da die molekularen Grundlagen der Destabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes durch FAD-Mutanten immer noch unklar sind, wurden hier besonders die Auswirkungen auf die lokale Bindung und Positionierung des Substrats untersucht.

Neben den pathophysiologischen Grundlagen der Krankheit wurden in dieser Arbeit zudem neu entwickelte GSMs genauer untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Frage gelegt, ob auch starke, A β ₄₃-produzierende PS1-FAD-Mutanten von neueren GSMs moduliert werden können. Dies ist von besonderer Bedeutung für potenzielle Studien mit FAD-Patienten, da in der Vergangenheit bestimmte Mutanten nicht oder nur wenig auf verschiedene GSMs reagiert haben. Zusätzlich wurde die Wirkung von GSMs *in vivo* in APP^{sw} transgenen Mäuse mittels Amyloid-PET, immunhistochemischen und biochemischen Methoden untersucht, um dadurch die Effekte der GSM-Behandlung auf die Plauepathologie genauer zu beleuchten. Dadurch sollte, zusammen mit den vorherigen Ergebnissen, die Eignung von GSMs als therapeutische Medikamente untersucht werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Publikation I: »Amyloid-PET predicts inhibition of *de novo* plaque formation upon chronic γ -secretase modulator treatment«

Diese Studie wurde publiziert als:

Brendel M*, Jaworska A*, Herms J*, **Trambauer J***, Rötzer C, Gildehaus FJ, Carlsen J, Cumming P, Bylund J, Luebbers T, Bartenstein P, Steiner H, Haass C, Baumann K, Rominger A. Amyloid-PET predicts inhibition of *de novo* plaque formation upon chronic γ -secretase modulator treatment. *Mol Psychiatry*. 2015 Jun 9. doi: 10.1038/mp.2015.74 (*geteilte Erstautorenschaft)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden, APP^{sw} exprimierende, transgene Mäuse über 6 Monate mit dem GSM RO5506284 (Abb. 13) behandelt und dabei longitudinal mittels Amyloid-PET analysiert. Nach der Behandlung wurden die beiden Gehirnhälften entweder biochemisch oder histopathologisch untersucht und die Ergebnisse mit den PET-Daten verglichen.

RO5506284 bewirkte *in vitro* eine robuste A β ₄₂- und A β ₄₀-Reduktion bei gleichzeitig erhöhtem A β ₃₈, ohne die Abspaltung der NICD zu beeinflussen. Für die chronische Behandlung über 6 Monate wurden 30 mg/kg GSM pro Tag eingesetzt. Die Tiere wurden ab einem Alter von 12 Monaten behandelt, da bei dieser Mauslinie die Plaqueablagerung in diesem Alter beginnt und so erst wenige Plaques vorhanden sind. Zu Beginn der Behandlung zeigten die PET-Startsignale eine große Variabilität zwischen den Tieren. Zusätzlich offenbarten diese, dass die zufällige Verteilung der Tiere in die Behandlungs-(GSM-) und die Kontrollgruppe (VEH) dazu führte, dass die GSM-Gruppe drei Tiere mit sehr hohen PET-Signalen beinhaltete. Die PET-Signale der VEH-Gruppe stiegen während der longitudinalen Messungen kontinuierlich an. In der GSM-Gruppe blieben die Signale im Mittel in etwa gleich bzw. stiegen nur leicht an. Interessanterweise zeigten die Tiere mit hohen PET-Startwerten einen stärkeren Anstieg des Signals, während die Signale der Tiere mit niedrigeren Startwerten kaum anstiegen. Tiere mit hohen Startwerten sprachen also schlechter auf die Behandlung an. Folglich könnte das Amyloid-PET-Signal zu Anfang einer Behandlung zur Vorhersage der Behandlungseffizienz genutzt werden. Die Analyse der A β -Spezies in der unlöslichen Gehirnfraction zeigte reduzierte A β ₄₂-, sowie unveränderte A β ₄₀- und A β ₃₈-Spiegel. Die drei Tiere mit den höchsten PET-Signalen zeigten auch in der biochemischen Analyse die höchsten A β ₄₂-Werte. Nach Korrektur der Daten mit Hilfe der PET-Startsignale als Kovariablen zeigte sich eine noch deutlichere Reduktion von A β ₄₂ in der unlöslichen Fraction,

um mehr als 50 %. Daraus ist ersichtlich, dass die Kombination der PET-Startsignale mit biochemischen Endpunktanalysen eine gute Möglichkeit darstellt, kleinere Effekte der Behandlung, welche durch die Variabilität zwischen den Tieren schwer zu erkennen waren, besser und klarer sichtbar zu machen. Die Analyse der immunhistochemischen Färbung der fibrillären A β -Plaques in der anderen Gehirnhemisphäre zeigte, nach Korrektur mithilfe der PET-Startwerte, ebenfalls eine Reduktion der gefärbten Plaquefläche und der Anzahl an Plaques in der GSM-Gruppe. Bei genauerer Analyse der Plaquegrößen fiel auf, dass in der VEH-Gruppe deutlich mehr kleinere Plaques vorkamen, während die behandelten Tiere mehr große Plaques aufwiesen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die GSM-Behandlung die Bildung neuer Plaques, die sogenannte *de novo*-Plaquebildung, reduzierte, dabei aber weniger Einfluss auf das weitere Wachstum schon vorhandener Plaques hatte.

Eigener Beitrag zu Publikation I

Im Rahmen dieses Kooperationsprojektes habe ich als einer der Erstautoren das für die biochemische Analyse des Gehirnmaterials benötigte ELISA-Protokoll optimiert und nachfolgend die Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse meiner Analysen sind in Abbildung 2 C und D sowie in Tabelle 1 dargestellt.

2.2 Publikation II: »Generation and deposition of A β ₄₃ by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer's disease«

Diese Studie wurde publiziert als:

Kretner B*, Trambauer J*, Fukumori A, Mielke J, Kuhn PH, Kremmer E, Giese A, Lichtenthaler SF, Haass C, Arzberger T, Steiner H. Generation and deposition of A β ₄₃ by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 2016 Mar 17. doi: 10.15252/emmm.201505952

(*geteilte Erstautorenschaft)

Zusammenfassung

Einige Präsenilin-FAD-Mutanten zeigen eine stark verringerte Gesamtaktivität, lösen aber dennoch die Alzheimer-Erkrankung aus. Um die Frage zu beantworten, ob dies durch diese reduzierte Aktivität oder, wie bei vielen anderen FAD-Mutanten, durch veränderte relative A β -Mengen auslösen, wurde exemplarisch die PS1 L435F Mutante genauer untersucht. Die Mutante wurde in HEK293sw-Zellen überexprimiert, sodass überwiegend mutiertes Präsenilin vorhanden war. Die Analysen bestätigten, dass die Mutante eine reduzierte Präsenilin-Endoproteolyse aufweist und die Akkumulation der APP-CTFs sowie eine stark reduzierte A β -Sekretion verursacht. Die Untersuchung des wenigen, noch vorhandenen A β mittels Immunblot (IB), Massenspektrometrie und speziesspezifischem A β -ELISA zeigte, dass neben A β ₄₀ und A β ₄₂ auch A β ₄₃ produziert wurde.

Um einen potenziellen Einfluss des noch vorhandenen endogenen Präsenilins in den HEK293sw-Zellen auszuschließen, wurde die Mutante in PS1/PS2-Doppel-KO-MEFs (murine embryonale Fibroblasten) transduziert. PS1 L435F verursachte dabei keine Defekte bei der Bildung des γ -Sekretasekomplexes. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der vorherigen Zellkulturexperimente hinsichtlich reduzierter Endoproteolyse und verringerter Gesamtaktivität bestätigt. Die Analyse der sekretierten A β -Spezies zeigte, dass die Zellen sehr wenig A β , jedoch hauptsächlich (\approx 80 %) A β ₄₃, produzierten. Das mutierte Protein produzierte also, ohne Interaktion mit etwaigem WT-Protein, große relative Mengen A β ₄₃ und könnte so in Übereinstimmung mit der AH die Krankheit auslösen. Diese Ergebnisse werden durch vorherige Analysen des ebenfalls schlecht endoproteolysierten und wenig aktiven PS1 R278I gestützt, das ebenfalls sehr hohe relative Mengen an A β ₄₃ sekretiert (Saito *et al.* 2011).

Um die Zellkulturexperimente zu bestätigen, wurden Hirnschnitte von zwei L435F-Mutationsträgern sowie zwei Kontrollen auf A β ₄₀, A β ₄₂ und A β ₄₃ hin untersucht. Die beiden Kontrollen, ein sAD- und ein FAD-Fall, zeigten eine sehr starke A β ₄₂-Färbung, etwas weniger A β ₄₀ und nur Spuren von A β ₄₃. Die beiden L435F-Fälle zeigten hingegen sehr starke Signale aller drei untersuchten A β -Spezies. Die Sekretion von A β ₄₃ durch PS1 L435F ist also kein Zellkulturartefakt oder der Überexpression geschuldet, sondern findet auch in den betroffenen Patienten statt.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass PS1 L435F trotz stark verringerter Gesamtaktivität große relative Mengen des amyloidogenen und neurotoxischen A β ₄₃ produziert, welches im Einklang mit der AH die Krankheit auslösen könnte, sodass die hier gezeigten Ergebnisse in Widerspruch zur PH stehen.

Eigener Beitrag zu Publikation II

Als einer der Erstautoren habe ich im Rahmen dieser Studie die meisten Experimente geplant und durchgeführt sowie Teile zum Manuskript beigetragen. Ich habe den Großteil der biochemischen Analysen und die Charakterisierung der verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Ausgenommen sind die ersten Experimente in Abbildung 1 A und B, die Generierung der stabilen MEF-Zelllinien sowie die Re-Sequenzierung des Hirnmaterials (Abbildung EV2) und dessen immunhistochemische Analysen (Abbildung 3, EV3, 4)

2.3 Publikation III: »A β ₄₃-producing PS1 FAD mutants cause altered substrate interactions and respond to γ -secretase modulation«

Diese Studie wurde publiziert als:

Trambauer J, Rodríguez Sarmiento RM, Fukumori A, Feederle R, Baumann K, Steiner H. A β ₄₃-producing PS1 FAD mutants cause altered substrate interactions and respond to γ -secretase modulation. *EMBO Rep.* 2020 Jan 7. doi: 10.15252/embr.201947996

Zusammenfassung

Um einen genaueren Einblick in die Effekte und Auswirkungen A β ₄₃-produzierender PS1-Mutanten zu gewinnen, wurden in der hier vorliegenden Studie einige dieser Mutanten näher betrachtet. Neben der allgemeinen Analyse der Gesamtaktivität, Endoproteolyse und der produzierten A β -Spezies wurde dabei vor allem der Einfluss der Mutanten auf die Positionierung von C99 im aktiven Zentrum von PS1 und die Reaktion auf Behandlung mit dem neuen GSM RO7019009 (Abb. 13) untersucht. Dafür wurden zwei Gruppen von PS1-Mutanten analysiert, die verschiedene biochemische Phänotypen abdecken. Die erste Gruppe umfasste neben der ausführlich untersuchten L166P Mutante zusätzlich die Y256S sowie die G382A Mutante. Diese Mutanten zeigten eine normale Endoproteolyse sowie eine annähernd unveränderte γ -Sekretaseaktivität. Die zweite Gruppe umfasste Mutanten, die eine mehr oder weniger stark verringerte Endoproteolyse zeigten. Hierbei wurden neben der in Publikation II untersuchten PS1 L435F noch die PS1 V261F und R278I Mutanten untersucht. Diese Mutanten produzierten deutlich erhöhte relative Mengen A β ₄₃, teils über 60 % des gesamten A β . Zudem zeigten sie eine deutlich verringerte Gesamtaktivität, besonders drastisch bei L435F und der hier neu charakterisierten V261F Mutante. Die artifizielle und nicht endoproteolytierte M292D Mutante diente als zusätzliche Kontrolle, da sie trotz nicht-gespaltenem PS1 eine unveränderte Gesamtaktivität und eine, im Vergleich zum WT, nur gering veränderte A β -Produktion aufweist. Unser Labor konnte bereits im Fall von zwei PS1-FAD-Mutationen, L166P und A246E, leichte Unterschiede in der Positionierung von C99 in PS1 zeigen (Fukumori & Steiner 2016). Deshalb wurde hier nachfolgend untersucht, ob die A β ₄₃-produzierenden Mutanten wegen ihres teils stärkeren Phänotyps auch stärkeren Einfluss auf die Positionierung des Substrats haben. Dafür wurden C99-Konstrukte genutzt, in die an verschiedenen Positionen *p*-Benzoyl-Phenylalanin-(Bpa-)Reste eingeführt wurden. Diese binden nach Induktion mit UV-Licht kovalent an Proteine in unmittelbarer Nähe. In der vorherigen Studie (Fukumori & Steiner 2016) wurden die Positionen V44, T48, T49 und L52 als besonders starke Interaktionspunkte zwischen C99 und dem

PS1-NTF identifiziert. Zusätzlich zu diesen Positionen wurde hier noch die Bindung der Position K54 an die Mutanten untersucht. Alle untersuchten Mutanten veränderten die Stärke der relativen Verknüpfungen, also die Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum. Trotz einiger Gemeinsamkeiten, wie Veränderung des Verhältnisses zwischen der Bindung an T48 und L49 bei besonders starken Mutanten, waren diese Veränderungen aber in ihrer Ausprägung immer mutantenspezifisch. Jede Mutante veränderte die Positionierung des Substrats unterschiedlich, ohne ein mit ihren weiteren Eigenschaften verknüpfbares Muster zu ergeben.

Im zweiten Teil der Studie wurden die Effekte des GSMs RO7019009 auf die jeweiligen Mutanten analysiert. RO7019009 stellte sich als ein sehr potenter Modulator heraus, mit einem niedrigen nanomolaren IC_{50} bezüglich der Reduktion der $A\beta_{42}$ -Produktion in HEK293sw-Zellen. Der GSM modulierte alle getesteten Mutanten. Dabei wurde die Menge an $A\beta_{38}$ erhöht und die Produktion von $A\beta_{43}$ effizient inhibiert. $A\beta_{42}$ konnte ebenfalls reduziert werden, wobei manche Mutanten hier teilweise verzögert reagierten. So reduzierte RO7019009 die $A\beta_{42}$ -Produktion bei L166P, R278I und V261F nur wenig oder erst bei sehr hohen Konzentrationen. Während der Modulator die Produktion von $A\beta_{38}$ in allen Mutanten erhöhte, war die Produktion von $A\beta_{37}$ nur bei einigen Mutanten erhöht, was auf eine mutantenspezifische Wirkung auf die verschiedenen Produktlinien schließen lässt. Im letzten Teil der Publikation wurden die Auswirkungen von RO7019009 auf die Positionierung des Substrats untersucht, wozu die Bindung von V44 an das PS1-NTF bei verschiedenen GSM-Konzentrationen gemessen wurde. Dabei zeigten sich abermals Unterschiede zwischen den Mutanten, die jedoch nicht generell mit der modulatorischen Aktivität von RO7019009 korreliert werden konnten.

In der Publikation konnte gezeigt werden, dass $A\beta_{43}$ -produzierende PS1-Mutanten, unabhängig von den Mutationseigenschaften, die Positionierung des Substrats individuell verändern. Da diese Fehlpositionierung bei allen bisher untersuchten Mutanten gezeigt werden konnte, könnte dies ein genereller, ihrer verringerten Prozessivität zugrundeliegender, Effekt von FAD-Mutanten sein. Der neue GSM RO7019009 modulierte alle Mutanten, die Effizienz war dabei aber von Mutante zu Mutante für die verschiedenen Spezies leicht unterschiedlich. Die Ergebnisse zeigen, dass auch starke $A\beta_{43}$ produzierende Mutanten von GSMs moduliert werden können und diese somit prinzipiell eine Therapieoption darstellen.

Eigener Beitrag zu Publikation III

Bei dieser Studie habe ich zur Konzeption der Experimente und Teile des Manuskripts beigetragen. Der Großteil der Experimente dieser Publikation wurde von mir ausgeführt. Ausgenommen davon sind Teile der Basischarakterisierung von RO7019009 (Abbildung 2D, Tabelle EV1) und dessen Synthese (Abbildung EV2).

2.4 Diskussion

Analysen der Auswirkungen von FAD-Mutationen in den betroffenen Proteinen sind wichtige Werkzeuge, um die molekularen Grundlagen der Alzheimer-Erkrankung zu verstehen. Da die familiäre und die sporadische Form der Krankheit sehr ähnlich verlaufen, wird davon ausgegangen, dass die über FAD gewonnenen Erkenntnisse auch auf die nicht-vererbte Form übertragbar sind. Die AH ist dabei die vorherrschende Theorie, um die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit zu erklären. Durch die bisherigen Misserfolge der anti-A β -Medikamente, kommen jedoch vermehrt alternative Theorien auf, die andere, von A β unabhängige, Faktoren für die Entstehung der Krankheit verantwortlich machen.

Im Gegensatz zur AH sieht die PH die Ursache der Alzheimer-Erkrankung nicht in erhöhten Mengen längerer A β -Spezies, sondern im Aktivitätsverlust der γ -Sekretase (Shen & Kelleher 2007). Sie wurde vor allem mithilfe der beiden PS1-FAD-Mutationen L435F und C410Y untersucht, die beide eine reduzierte Aktivität aufweisen, jedoch trotzdem die Alzheimer-Erkrankung verursachen (Heilig *et al.* 2010, Heilig *et al.* 2013). Der starke Funktionsverlust der Mutation führt dazu, dass homozygote L435F knock-in-(KI-)Mäuse einen mit dem PS1-KO vergleichbaren Phänotyp zeigen (Xia *et al.* 2015). Heterozygote KI/WT-Mäuse sekretieren weniger A β als der WT, zeigen aber nur ein wenig erhöhtes A $\beta_{42/40}$ -Verhältnis. KI/WT-Mäuse, denen zusätzlich noch beide Kopien des für PS2 kodierenden Gens *PSEN2* fehlen, haben zudem eine verringerte synaptische Aktivität sowie Gedächtnisprobleme (Xia *et al.* 2015). Inwieweit diese Erkenntnisse auf Patienten übertragbar sind bleibt jedoch fraglich, da heterozygote PS1-Mutationsträger noch beide *PSEN2*-Allele besitzen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Verlust von PS1 die Expression von PS2 verstärkt (Watanabe *et al.* 2014), sodass die essenziellen γ -Sekretasefunktionen in Mutationsträgern durch PS2-haltige Komplexe kompensiert werden könnten. Trotz dieser Kritik wird ein Zusammenhang zwischen verringerter Präsenilinaktivität und Neurodegeneration diskutiert, sodass die Frage bleibt, ob die Inhibition der A β -Produktion oder eher die Aktivierung der γ -Sekretaseaktivität der therapeutisch richtige Ansatz zur Bekämpfung der Alzheimer-Erkrankung ist.

In den hier beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass PS1 L435F, trotz stark verminderter Endoproteolyse und sehr wenig sekretiertem A β , keine komplett inaktive Mutante ist, sondern hohe relative Mengen des toxischen und sehr stark aggregierenden A β_{43} produziert (Saito *et al.* 2011, Zou *et al.* 2013, Burnouf *et al.* 2015, Meng *et al.* 2015). Dasselbe Bild zeigt sich auch für die hier neu charakterisierte PS1 V261F Mutante, sowie die schon bekannte PS1 R278I Mutante (Saito *et al.* 2011). Im Rahmen der PH wurde postuliert, dass mutiertes Präsenilin einen Komplex mit dem WT-Protein eingehen könnte und so durch einen trans-dominanten,

allosterischen Effekt dafür sorgen könnte, dass das WT-Protein eine veränderte Konformation einnimmt und vermehrt A β ₄₂ produziert (Heilig *et al.* 2013, Zhou *et al.* 2017). Die Versuche mit PS1 L435F in PS1/2-KO-MEF-Zellen zeigen jedoch, dass die Mutante auch in der Abwesenheit von WT-Protein A β ₄₃ produziert. Eine parallel publizierte Studie zeigte ähnliche Ergebnisse für die PS1 L435F und C410Y Mutanten und bestätigt die hier präsentierten Daten (Veugelen *et al.* 2016). Da sich einige Studien (Heilig *et al.* 2010, Heilig *et al.* 2013, Zhou *et al.* 2017) nur auf A β ₄₀ und A β ₄₂ konzentrierten, wurde die hier beschriebene Produktion von A β ₄₃ lange übersehen, was zu falschen Schlüssen hinsichtlich der A β -Sekretion dieser Mutanten führte.

Die erhöhte Produktion von A β ₄₃ konnte durch Färbungen der Gehirne von Alzheimer-Patienten bestätigt werden. So fanden sich in den Gehirnen der Kontrollen, einem sAD- und einem FAD-Fall, vor allem A β ₄₂ enthaltende Amyloidplaques. In Übereinstimmung mit einer vorherigen Studie (Heilig *et al.* 2010) zeigten die untersuchten L435F-Mutationsträger ebenfalls deutliche A β ₄₀- und A β ₄₂-Färbung, zusätzlich jedoch auch eine prominente A β ₄₃-Färbung, die in den Kontrollen kaum vorhanden war. Dies lässt darauf schließen, dass die A β ₄₃-Produktion von PS1 L435F kein Zellkultur- oder Überexpressionsartefakt ist, sondern die Befunde auch in Patienten zu finden sind. Diese nur wenig aktive PS1-Mutanten stehen also nicht wie zuvor publiziert (Heilig *et al.* 2010, Xia *et al.* 2015) im Widerspruch zur AH, da die erhöhte Produktion des neurotoxischen und schnell aggregierenden A β ₄₃ ihre Pathogenität erklären kann.

Präsenilin-FAD-Mutanten erhöhen das Verhältnis der längeren gegenüber den kürzeren A β -Spezies. Das A β ₄₂/A β ₄₀-Verhältnis wird als Maß für die potenzielle Pathogenität von Präsenilin-FAD-Mutanten genutzt und korreliert mit dem Alter, in dem die spezifischen Mutanten die Krankheit auslösen (Tang & Kepp 2018). In vielen Studien werden speziesspezifische ELISAs zur Analyse der A β -Sekretion genutzt, wobei die Analysen oft auf A β ₄₀ und A β ₄₂ beschränkt sind, sodass die Produktion des etwas längeren A β ₄₃ oft übersehen, bzw. nicht gesondert untersucht wird. Dadurch wird bei Mutanten, wie den hier analysierten PS1 V261F, R278I und L435F, die nur sehr wenig A β ₄₂ und A β ₄₀ produzieren, der Großteil der produzierten pathogenen A β -Spezies übersehen, was dazu führt, dass ihre Pathogenität schwer zu erklären ist. Durch ihre starke A β ₄₃-Produktion besitzen diese Mutanten allerdings ein erhöhtes A β ₄₂₊₄₃/A β ₄₀-Verhältnis, das eine, mit der AH vereinbare, Erklärung ihrer Pathogenität sein könnte. Dieses kombinierte Verhältnis könnte also eine präzisere Messgröße für die Pathogenität der Mutanten sein. Die Kombination beider längerer A β -Spezies könnte damit auch besser erklären, warum PS1 L166P und Y256S, die beide große Mengen A β ₄₂ und A β ₄₃ produzieren, die Krankheit schon so früh auslösen (Moehlmann *et al.* 2002, Miklossy *et al.* 2003). Eine genaue Analyse aller von potenziellen Mutanten produzierten A β -Spezies ist also essenziell für eine präzise Einschätzung ihrer Pathogenität.

Der AH zufolge ist A β der entscheidende Faktor für die Entstehung der Krankheit. Die genaue Analyse, warum FAD-Mutanten pathogene A β -Verhältnisse produzieren, ist daher sehr wichtig, um neue Therapieoptionen eröffnen zu können. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass im Fall der Präsenilin-FAD-Mutationen vor allem die Prozessivität, also die schrittweise C-terminale Verkürzung der A β -Peptide, verringert wird. Sie zeigen eine erhöhte Dissoziation des pathogenen A β_{42} und eine geringere Stabilität des entsprechenden Enzym-Substrat-Komplexes zwischen Präsenilin und A β . Beides führt dazu, dass die längeren Spezies schlechter in kürzere Spezies prozessiert werden und früher von der Protease freigegeben werden (Okochi *et al.* 2013, Szaruga *et al.* 2017, Trambauer *et al.* 2020a).

Die A β_{43} produzierenden FAD-Mutanten (Publikation III) verursachen eine veränderte Positionierung des Substrats C99 in der Protease. Die Quervernetzungen zwischen PS1 und den, um die ϵ -Schnittstelle im Substrat herumliegenden, untersuchten Positionen sind teilweise stark verändert. Dies deutet auf eine veränderte Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum hin, welche durch eine von der Mutation veränderte Konformation der γ -Sekretase erklärt werden könnte. Die beobachteten Veränderungen treten bei allen bisher untersuchten PS1-Mutanten, unabhängig von deren biochemischen Eigenschaften oder ihren Auswirkungen auf die A β -Produktion, auf. Diese mutanteninduzierte Fehlpositionierung könnte also eine der wesentlichen molekularen Grundlagen für die reduzierte Prozessivität der FAD-Mutanten sein. Die, durch FAD-Mutationen induzierte, Konformationsänderungen und die damit einhergehende Fehlpositionierung des Substrats könnten folglich die Stabilität der Interaktion zwischen Enzym und Substrat verringern. Dies könnte die erhöhte, zu frühe Dissoziation der längeren A β -Spezies von der Protease (Okochi *et al.* 2013, Szaruga *et al.* 2017, Trambauer *et al.* 2020a) erklären und so einen allgemeinen molekularen Mechanismus der pathogenen Auswirkungen von Präsenilin-FAD-Mutanten darstellen.

Verschiedene Zellkulturstudien der letzten Jahre konnten zeigen, dass die immer weiter veränderten und verbesserten GSMs in der Lage sind die A β_{42} -Produktion vieler APP- und Präsenilinmutanten zu reduzieren (Trambauer *et al.* 2020a). Zusätzlich konnte die Wirksamkeit der GSMs auch in, aus iPSCs differenzierten, humanen neuronalen Kulturen bestätigt werden. Jedoch konzentrierten sich auch die neueren Studien vor allem auf A β_{42} , weshalb die Auswirkungen auf A β_{43} nicht genauer beleuchtet wurden. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Reaktion der verschiedenen A β_{43} produzierenden PS1-Mutanten auf den neuen GSM RO7019009 analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der neue GSM RO7019009 in der Lage ist, die Produktion von A β_{43} in allen getesteten Mutanten, auch denen mit stark verminderter Aktivität, zu reduzieren. Hierbei wurden für die A β_{42} -Reduktion bei einigen

Mutanten höhere Konzentrationen des Modulators benötigt, so z. B. im Fall von PS1 L166P. Schon in früheren Studien (Hahn *et al.* 2011, Kretner *et al.* 2011) konnten die damals getesteten GSMs die A β ₄₂-Produktion dieser Mutante nicht oder nur sehr schwach inhibieren. Im Gegenzug wurde jedoch eine Steigerung der A β ₃₈-Sekretion beobachtet, die damals aber nicht richtig erklärt werden konnte. Diese verstärkte A β ₃₈-Produktion konnte in den hier gezeigten Experimenten mit RO7019009 wiederholt werden. Dabei werden die Mengen beider pathogener Spezies, A β ₄₂ und A β ₄₃, reduziert, wobei die Produktion von A β ₄₃ jedoch deutlich stärker inhibiert werden kann. Dies spricht dafür, dass das entstehende A β ₃₈ zu einem guten Teil aus A β ₄₃ entsteht. Obwohl die Effekte auf A β ₄₃ in den vorhergehenden Studien (Hahn *et al.* 2011, Kretner *et al.* 2011) nicht untersucht wurden und unklar ist, wie stark die dort getesteten GSMs auf A β ₄₃ wirkten, könnten die hier gezeigten Ergebnisse die damals beobachtete A β ₃₈-Produktion erklären. Die getesteten Mutanten sekretierten nach Behandlung mit dem GSM vor allem kürzere A β _{37/38}-Spezies, welche, anders als die längeren, nicht neurotoxisch sind, sondern eventuell sogar schützend wirken können (Moore *et al.* 2018). Nicht nur die Produktion von A β ₄₂ und A β ₄₃, auch die der kürzeren Spezies A β ₃₇ und A β ₃₈, wird dabei je nach Mutante unterschiedlich durch den GSM verändert. Die Kontrollen, PS1 WT und M292D, produzieren nach Modulation gleiche Mengen beider kurzer Spezies, während PS1 V261F und L435F geringere Mengen A β ₃₇ produzieren. Bei den anderen Mutanten erhöht der Modulator nur die Sekretion von A β ₃₈. Obwohl alle Mutanten generell auf den GSM reagieren, zeigen sie eine individuell veränderte Sekretion der verschiedenen A β -Spezies, die beiden Produktlinien werden also unterschiedlich beeinflusst. Aufgrund der konformationellen Heterogenität der γ -Sekretase (Bai *et al.* 2015a, Elad *et al.* 2015) wird davon ausgegangen, dass die Effizienz der Prozessivität stark von der jeweiligen Konformation der Protease beeinflusst wird (Uemura *et al.* 2009). Analog dazu könnten auch die beiden Produktlinien in bestimmten Konformationen unterschiedlich beeinflusst werden. Die Ergebnisse könnten also dadurch erklärt werden, dass verschiedene Konformationen der γ -Sekretase die GSMs besser oder schlechter binden, bzw. der Modulator je nach Konformation unterschiedlich effizient wirken kann und so je nach Mutante/Konformation die A β -Produktion verschieden beeinflusst wird.

Weitere Experimente konnten zeigen, dass die photoinduzierten Quervernetzungen zwischen C99 und PS1 durch Behandlung mit GSMs verändert werden. Dies bestätigt, dass GSMs die Konformation der γ -Sekretase verändern können (Lleo *et al.* 2004, Uemura *et al.* 2009, Crump *et al.* 2011, Ohki *et al.* 2011, Takeo *et al.* 2014). Da die Mutanten allerdings wieder individuell, unterschiedlich starke Reaktionen zeigen, die nicht immer mit der Effektivität der GSM-Behandlung korreliert werden können, sind die beobachtete Veränderung der Verknüpfung vermutlich nicht direkt mit der Aktivität des Modulators assoziiert. Es könnte also sein, dass

GSMs eine veränderte Konformation der γ -Sekretase erzeugen, die weniger die Positionierung des initialen Substrats C99 entscheidend verändert, sondern sich erst später, bei der Bindung der neu gebildeten, langen A β -Spezies bemerkbar macht. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass GSMs zwar die Prozessivität, also die Effizienz der γ - und ζ -Spaltung, erhöhen, aber keinen Effekt auf die initiale ε -Spaltung haben (Ebke *et al.* 2011, Dimitrov *et al.* 2013). Um genauere Einblicke zu bekommen, wie GSMs die Interaktion zwischen Präsenilin und Substrat verändern, müssten statt photoquervernetzbaren C99-Derivaten entsprechend veränderte, längere A β -Peptide, wie A β_{42} oder A β_{43} , untersucht werden.

Frühere Studien mit transgenen Alzheimer-Mausmodellen haben gezeigt, dass mit GSMs behandelte Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Plaquedichte und -fläche aufweisen und die Menge an A β_{42} abnimmt (Eriksen *et al.* 2003, Imbimbo *et al.* 2010, Kounnas *et al.* 2010, Trambauer *et al.* 2020a). Verbesserte, nicht-invasive Analysemethoden, wie z.B. PET, erlauben inzwischen auch die Untersuchung der behandelten Tiere vor und während des Experiments. Um die Wirkung von aktuellen GSMs *in vivo* longitudinal zu analysieren, wurden humanes APP_{sw} exprimierende Mäuse mit dem GSM RO5506284 behandelt. Die longitudinalen PET-Messungen wurden dabei mit biochemischen und immunhistochemischen post mortem Analysen der Gehirne der Tiere ergänzt. Die longitudinalen PET-Messungen, und dabei vor allem die Bestimmung des Amyloidspiegels zu Beginn der Studie, ermöglichen die teils sehr variablen Tierpopulationen besser miteinander zu vergleichen und die Reaktion einzelner Tiere auf die Behandlung zu untersuchen. So wurden schwer erkennbare Effekte, wie die Abhängigkeit des GSM-Effekts vom Amyloidspiegel beim Start der Behandlung, erst durch die Kombination von longitudinalen Daten und Endpunktanalysen sichtbar. Dies ermöglicht eine deutlich bessere Analyse des Wirkmechanismus. Die Korrektur von Endpunktbestimmungen, wie A β -Spiegel oder der Plaquedichte im Gehirn, mithilfe der Startwerte hilft die Streuung der Messwerte zu minimieren. Dadurch können kleinere Effekte erkennbar werden, die sonst, durch die hohe Variabilität der Tiere untereinander, im Rauschen der Varianz übersehen würden. Die Kombination verschiedener Methoden mit longitudinalen Messungen ist also vor allem bei sehr heterogenen Versuchsgruppen, wie z.B. menschlichen Probanden, von immenser Bedeutung, um auf die richtigen Ergebnisse schließen zu können.

Die hier vorgestellte Studie bestätigt die Daten früherer Untersuchungen, die zeigen konnten, dass GSM-Behandlung die Anzahl der Plaques reduzieren kann, jedoch nur geringere Effekte auf die Plaquergröße hat (Rogers *et al.* 2012). GSMs scheinen die Menge der längeren A β -Spezies so weit zu reduzieren, dass die kritische Konzentration zur Bildung von Nukleationskernen nicht mehr erreicht wird und so keine neuen Plaques entstehen können. Die verbleibenden A β -Peptide können sich aber immer noch an bestehende Plaques anlagern. Es muss also weiter untersucht

werden, ob der Effekt der GSMs stark genug ist, um die pathogenen A β -Mono-, Di- oder Oligomere weit genug zu reduzieren, und so die Krankheit zu verhindern. Die longitudinalen Daten haben gezeigt, dass bereits vorhandene Plauepathologie die Wirksamkeit der Behandlung verringert. Dies ist insofern von Bedeutung als eine schon fortgeschrittene Krankheitsentwicklung in den entsprechenden Patienten als einer der wichtigsten Gründe für die großteils negativen Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien angenommen wird.

Obwohl in diesen Studien Sekretaseinhibitoren und anti-A β -Antikörper getestet wurden, scheint ein möglichst früher Therapiebeginn auch bei GSM-Studien von großer Bedeutung zu sein. Aktuell werden verschiedene GSMs in Phase-I-Studien getestet, um ihre Wirksamkeit im Menschen und die Sicherheit der Behandlung zu testen. Die Versuche in gesunden Freiwilligen zeigen, dass die aktuellen GSMs in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und dadurch die A β ₄₀- und A β ₄₂-Mengen im CSF der Probanden deutlich zu senken sowie die Mengen der kurzen Spezies A β ₃₇ und A β ₃₈ zu erhöhen (Kounnas *et al.* 2019, Ahn *et al.* 2020). Die gemessenen, erhöhten Mengen kürzerer A β -Spezies zeigen, dass die präklinischen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Da aktuelle Studien darüber hinaus keine Lebertoxizität nachweisen konnten, scheinen die derzeit klinisch getesteten GSMs deutlich weniger Nebenwirkungen zu haben als ältere Substanzen (Bursavich *et al.* 2016, Kounnas *et al.* 2019, Ahn *et al.* 2020). Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie heben erneut die Bedeutung eines möglichst frühen Beginns der Behandlung, vor oder zu Beginn der A β -Pathologie, hervor. In klinischen Studien müssten also potenzielle Patienten behandelt werden, bei denen die Krankheit noch nicht ausgebrochen ist. Allerdings bieten derzeit nur Studien mit FAD-Mutationsträgern die Möglichkeit der sehr frühen Intervention. Daher sind die GSMs ein weiterer, potenzieller Ansatz, der im Rahmen von Studien mit Kohorten des DIAN- oder API-Netzwerkes, in denen aktuell A β -Antikörper untersucht werden (Reiman *et al.* 2011, Moulder *et al.* 2013, Trambauer *et al.* 2020a), getestet werden könnte. Da die Behandlung mit GSMs anscheinend keine Effekte auf schon existierende Plaques hat, könnte auch eine Kombination verschiedener Medikamente eine mögliche Behandlungsstrategie sein. So könnten Antikörper gegen fibrilläres oder oligomeres A β die vorhandenen Plaques entfernen, während gleichzeitig die Behandlung mit GSMs die Produktion längerer A β -Spezies hemmt, wodurch keine neuen Plaques gebildet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, entgegen vorheriger Publikationen, besonders schwach aktive und verringert endoproteolytierte PS1-FAD-Mutanten noch geringe Mengen des stark toxischen und aggregierenden A β ₄₃ produzieren und so gemäß der AH die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung auslösen können. Im Weiteren wurde gezeigt, dass diese und weitere A β ₄₃-produzierende PS1-Mutanten die Positionierung des Substrats C99 im

PS1 verändern und so eine Fehlpositionierung erzeugen. Diese könnte eine wesentliche Grundlage des destabilisierten Enzym-Substrat-Komplexes, und damit mitverantwortlich für die geringere Prozessivität der γ -Sekretase und der damit einhergehenden stärkeren Sekretion längerer A β -Spezies sein. Der neue GSM RO7019009 ist in der Lage alle untersuchten Mutanten zu modulieren und damit die Produktion beider längerer Spezies so zu verschieben, dass primär nicht-toxische kurze A β -Spezies sekretiert werden. Die Wirkung von GSMs ist dabei auch auf *in vivo*-Modelle übertragbar. So kann der GSM RO5506284 die *de novo*-Plaquebildung in transgenen Mäusen hemmen. Die Ergebnisse geben Hoffnung, dass GSMs eine wirkliche Therapieoption sein können und sogar Patienten, die von starken, A β_{43} -assoziierten FAD-Mutationen betroffen sind, mit Modulatoren behandelt werden können.

3 Material und Methoden

Im Folgenden sind die verwendeten Methoden und die entsprechenden Materialien kurz beschrieben. Im Allgemeinen wurden Standardgeräte des Laboralltags sowie Standardchemikalien verwendet. Spezielle Chemikalien bzw. Geräte sind gesondert im Text erwähnt. Die verwendeten Lösungen sind am Anfang der jeweiligen Methode aufgeführt.

3.1 Antikörper

Die folgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit genutzten Antikörper. Maus- und Ratte-Antikörper sind monoklonal, während Kaninchen-Antikörper immer polyklonalen Ursprungs sind (Ausnahmen sind vermerkt).

Antikörper	Epitop	Spezies	IB	IP	Quelle/Referenz
PS1N	PS1-NTF, AS 41-49	M	1:1000	-	(Capell <i>et al.</i> 1997)
NT1	PS1-NTF, AS 41-49	M	1:2000	-	Covance
2G7	PS1-NTF, AS 39-52	M	3 µg/ml	-	(Trambauer <i>et al.</i> 2020b)
5E12	PS1-CTF, AS 313-333	R	2,5 µg/ ml	-	(Kretner <i>et al.</i> 2016)
3027	PS1-CTF, AS 263-407	K	1:4000	-	(Walter <i>et al.</i> 1997)
BI.HF5c	PS2-CTF, AS 297-356	M	1:2000	-	(Steiner <i>et al.</i> 1999b)
N1660	NCT, AS 693-709	K	1 µg/ml	-	Sigma
6687	APP ₆₉₅ , AS 675-695	K	1:1000	-	(Steiner <i>et al.</i> 2000)
Y188	APP-CTF ¹	K ²	1:4000	-	Abcam
22C11	APP, AS 66-81	M	1:5000	-	Merck
2D8	Aβ, AS 1-16	R	3 µg/ml 1:25 ³	-	(Shirotani <i>et al.</i> 2007)
2D8-Biotin	Aβ, AS 1-16	R	-	1:1000 ⁴	(Shirotani <i>et al.</i> 2007)
3552	Aβ, AS 1-40	K	-	1:500- 1:7500	(Yamasaki <i>et al.</i> 2006)
4G8	Aβ, AS 17-24	M	-	1:500- 1:2500	Covance
Aβ ₃₈ -Ruthenium	Aβ ¹	M	-	1:800 ⁴	MSD
BAP24- Ruthenium	Aβ, AS 34-40	M	-	1:2000 ⁴	F. Hoffmann La Roche (Brockhaus <i>et al.</i> 1998)
BAP15- Ruthenium	Aβ, AS 36-42	M	-	1:800 ⁴	F. Hoffmann La Roche (Brockhaus <i>et al.</i> 1998)
Aβ ₃₇ (D2A6H)	Aβ ₃₇ , C-Terminus	K ²	-	1:1200 ⁴	Cell Signaling
IBL-Aβ ₄₀	Aβ ₄₀ , C-Terminus ¹	K	2 µg/ml	-	IBL
IBL-Aβ ₄₂	Aβ ₄₂ , C-Terminus ¹	K	2 µg/ml	-	IBL
IBL-Aβ ₄₃	Aβ ₄₃ , C-Terminus ¹	K	2 µg/ml	-	IBL
Val50	AICD ₅₀	M	5 µg/ml	-	Eli Lilly

Antikörper	Epitop	Spezies	IB	IP	Quelle/Referenz
Penta-His	His ₆ -Peptid	M	1:2000	-	Qiagen
AT-8	PHF-Tau ¹	M	1:200 ⁵	-	Thermo Scientific
α -Maus-HRP	Maus IgG ¹	Z	1:5000	-	Promega
α -Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG ¹	Z	1:10000	-	Promega
α -Ratte-HRP	Ratte IgG ¹	Z	1:3333	-	SantaCruz
α -Ratte-HRP	Ratte IgG ¹	Z	1:3333	-	Merck

AS: Aminosäure; **IB:** Immunblot; **IP:** Immunpräzipitation; **M:** Maus; **K:** Kaninchen; **R:** Ratte; **Z:** Ziege

¹genaues Epitop vom Hersteller nicht angegeben

²monoklonaler Antikörper

³unverdünnter Hybridomaüberstand

⁴Verdünnung für Elektrochemilumineszenz-Immunassays

⁵Verdünnung für Immunhistochemie

3.2 Zelllinien

Die folgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit genutzten Zelllinien. Im Fall der PS1-Mutanten wurde in der Regel mit Einzelzellklonen gearbeitet.

Zelllinie	Klon-Nr.	Resistenzen	Transgene	Referenz
HEK293sw	unbekannt	G418	APPsw	(Citron <i>et al.</i> 1996)
HEK293sw/PS1 WT	Pools Klon 23	G418, Zeocin	APPsw, PS1 WT	(Okochi <i>et al.</i> 2000)
HEK293sw/PS1 L166P	Klon 12	G418, Zeocin	APPsw, PS1 L166P	(Moehlmann <i>et al.</i> 2002)
HEK293sw/PS1 Y256S	Klon 21	G418, Zeocin	APPsw, PS1 Y256S	(Trambauer <i>et al.</i> 2020b)
HEK293sw/PS1 V261F	Klon 14	G418, Zeocin	APPsw, PS1 V261F	(Trambauer <i>et al.</i> 2020b)
HEK293sw/PS1 R278I	Klon 9	G418, Zeocin	APPsw, PS1 R278I	(Trambauer <i>et al.</i> 2020b)
HEK293sw/PS1 M292D	Klon 2	G418, Zeocin	APPsw, PS1 M292D	(Steiner <i>et al.</i> 1999c)
HEK293sw/PS1 G382A	Klon 2	G418, Zeocin	APPsw, PS1 G382A	(Pérez-Revuelta <i>et al.</i> 2010)
HEK293sw/PS1 D385A	Pools	G418, Zeocin	APPsw, PS1 D385A	(Steiner <i>et al.</i> 2000)
HEK293sw/PS1 L435F	Pools Klon 10	G418, Zeocin	APPsw, PS1 L435F	(Kretner <i>et al.</i> 2016)
MEF PS1/2 DKO	Pools	-	-	(Herreman <i>et al.</i> 1999)
MEF DKO PS1 WT	Pools	-	PS1 WT	(Kretner <i>et al.</i> 2013)
MEF DKO PS1 L435F	Pools	-	PS1 L435F	(Kretner <i>et al.</i> 2016)

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Primer und Plasmide

Zur Überexpression in HEK293sw-Zellen wurden die entsprechenden PS1-Mutationen mittels zielgerichteter Mutagenese (vgl. 3.3.2) in PS1-WT (in pcDNA3.1TM/Zeo⁽⁺⁾, Invitrogen) eingeführt. Folgende Tabelle enthält die verwendeten Primerpaare. Die veränderten Basen sind fett gedruckt dargestellt.

Primer	Sequenz
V261F-for	GTGGCTTTTTGTGTCCGAAAG
V261F-rev	CACAAAAAAGCCACTAAATCATATACTG

PS1 R278I, L435F und M292D enthaltende Plasmide waren bereits im Labor vorhanden und konnten ohne weitere Modifikation zur Transfektion genutzt werden. PS1 Y256S wurde mittels BamHI/XhoI-Restriktionsverdau aus einem pcDNA4TM/HisC-Vektor (Invitrogen) in pcDNA3.1TM/Zeo⁽⁺⁾ subkloniert. Zur stabilen Expression von PS1 L435F Mutanten in MEF-Zellen wurden das Konstrukt in den FU-ΔZeo Vektor umkloniert (Kuhn *et al.* 2010, Kretner *et al.* 2013).

3.3.2 Zielgerichtete Mutagenese von Vektoren

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden mittels PCR ein oder mehrere Basenpaare der zirkulären Plasmid-DNA ausgetauscht. Hierbei wurden Primer verwendet, die schon die gewünschte veränderte Sequenz besaßen. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, sollten die Primer die betreffende Sequenz auf beiden Seiten mit mindestens 10 Basenpaare (Bp) flankieren. Der Ansatz beinhaltete folgende Komponenten:

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	10 ng
Vorwärtsprimer (100 pmol/μl)	0,5 μl
Rückwärtsprimer (100 pmol/μl)	0,5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 μl
10x Reaktionspuffer	2 μl
Pwo-Polymerase	1 μl
H ₂ O	ad 20 μl

Die Reaktion wurde mit folgendem Programm im PCR-Block inkubiert:

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
Denaturierung	30 s	95 °C	16
Primeranlagerung	50 s	50-60 °C ¹	
Elongation	2 min/kBp ²	68 °C	
Abschließende Elongation	2 min/kBp ²	68 °C	1

¹Die Anlagerungstemperatur hängt von der Schmelztemperatur (T_m) der Primersequenz ab. Üblicherweise wurde $T_m - 5$ °C genutzt.

²Die Elongation benötigte 2 min/kBp erwartete Fragmentlänge. Die abschließende Elongation dauerte mindestens so lange wie die vorangegangenen Elongationsschritte.

Nach der Reaktion wurde das Produkt mit 1 µl *DpnI* für 1 h bei 37 °C inkubiert um die methylierte Ursprungs-DNA, nicht aber das neue Amplifizierungsprodukt, zu verdauen.

3.3.3 Transformation von DNA in *E. coli*

LB-Medium 1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 17,25 mM NaCl

Vor der Transformation wurden die entsprechenden kompetenten Zellen (vgl. 3.4.1) auf Eis aufgetaut. 60 µl kompetente Zellen wurden mit 1 µl aufgereinigter DNA gemischt. Zur Transformation nach zielgerichteter Mutagenese wurde die Hälfte eines *DpnI*-Verdauansatzes (in der Regel ~10 µl) eingesetzt. Die Zellen wurden zuerst 20 min auf Eis und danach 60 s bei 42 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde den Zellen 300 µl LB-Medium zugesetzt. Dann wurde die Suspension für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Etwa 250 µl der Suspension wurden auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.4 Proteinexpression in *E. coli*

3.4.1 *E. coli*-Linien

Zur Expression und Aufreinigung von C99 wurde das Konstrukt (in pQE60, Qiagen) in *E. coli* BL21(DE3)_{RIL}-Zellen transformiert (Edbauer *et al.* 2003). Für die Expression der photoquervernetzbaaren C99-Bpa-Konstrukte wurden die Basentriplets der zu analysierenden Aminosäuren durch ein TAG-(Amber-)Stopcodon ersetzt. Diese Konstrukte wurden zusammen mit pDule-*pBpa*, welches die Bpa-spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase und die entsprechende TAG-(Amber-)Suppressor-tRNA exprimiert (Chin *et al.* 2002), in *E. coli* Rosetta-Zellen (Novagen) transformiert. In dieser Arbeit wurden die Positionen V44, T48, L49, L52 und K54 analysiert (Konstrukte publiziert in (Fukumori & Steiner 2016)). Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden die entsprechenden Konstrukte in DH5 α -Zellen transformiert.

3.4.2 Expression von C99

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 17,25 mM NaCl
Amp/Chlor-Medium	LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (1000x Stocklösung in 50 % Ethanol) und 15 μ g/ml Chloramphenicol (1000x Stocklösung in Ethanol)
Amp/Tet-Medium	LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (1000x Stocklösung in 50 % Ethanol) und 5 μ g/ml Tetracyclin (1000x Stocklösung in Ethanol)
IPTG	1 M IPTG in H ₂ O
Tris-Puffer	2 M Tris-HCl pH 8,5
Bpa-Lösung	50 mM <i>p</i> -Benzoyl-L-Phenylalanin (Bpa) in 1 M HCl

Zur Expression von C99 in BL21(DE3)_{RIL}-Zellen wurden 50 ml Vorkultur (Amp/Chlor -Medium) mit den entsprechend transformierten Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 800 ml Amp/Chlor-Medium verdünnt und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und weitere 3-4 h geschüttelt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 10 min) geerntet. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Expression von mit Bpa markiertem C99 wurden 50 ml Vorkultur der entsprechenden Zellen in Amp/Tet -Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag in 500 ml Amp/Tet-Medium verdünnt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde die Expression durch Zugabe von 300 μ l IPTG, 5 ml Bpa-Lösung und 2,5 ml Tris-Puffer induziert. Nach 6-7 h Expression bei 37 °C wurden die Zellen geerntet (6000 g, 4 °C, 10 min) und entweder weiterverarbeitet oder bei 20 °C gelagert.

3.4.3 Reinigung von C99

TE-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA
Harnstoffpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,5; 6 M Harnstoff; 1 % Triton X-100; 1 % SDS; 1 mM CaCl ₂ ; 100 mM NaCl
Verdünnungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
Triton-Waschpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 % Triton X-100
SDS-Waschpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,5; 300 mM NaCl; 0,2 % SDS
Imidazol-Waschpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,5; 300 mM NaCl; 0,2 % SDS; 20 mM Imidazol
Elutionspuffer 1	20 mM Tris-HCl pH 8,5; 300 mM NaCl; 0,2 % SDS; 100 mM Imidazol
Elutionspuffer 2	20 mM Tris-HCl pH 8,5; 300 mM NaCl; 0,2 % SDS; 500 mM Imidazol

Die Zellpellets (vgl. 3.4.2) wurden in 10 ml/g (Zellmasse) TE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis sonifiziert (30 s Puls/30 s Pause). Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert (17000 g, 12 °C, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nochmals im gleichen Volumen TE-Puffer wie oben aufgenommen, 10 min auf Eis sonifiziert (30 s Puls/30 s Pause) und erneut zentrifugiert (17000 g, 12 °C, 10 min). Das Pellet dieses zweiten Zentrifugationsschritts wurde in 4 ml Harnstoffpuffer (inkl. PI ohne EDTA, cOmplete EDTA-free, Roche) pro g des ursprünglichen Zellpellets resuspendiert und über Nacht bei 4 °C rotiert. Am nächsten Tag wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (17000 g, 12 °C, 10 min). Der Überstand wurde 1:5 in Verdünnungspuffer verdünnt und mit 1 ml 50%iger Suspension Ni-NTA-Agarose (Qiagen) für 1-2 h bei RT rotiert. Danach wurde die Agarose pelletiert (1000 g, 4 °C, 5 min), im fünffachen Agarosevolumen (2,5 ml bei 1 ml 50%iger Suspension) in Triton-Waschpuffer resuspendiert und auf eine Leersäule (Poly-Prep® Chromatography Columns, Bio-Rad) gegeben. Die Triton-Waschfraktion wurde aufgefangen und das Säulenmaterial danach mit jeweils 5 Säulenvolumen (Agarosevolumen) SDS- und Imidazol-Waschpuffer gewaschen. C99 wurde mit 3 Säulenvolumen Elutionspuffer 1 eluiert und die verbliebenen Reste danach mit 1 Säulenvolumen Elutionspuffer 2 von der Säule gelöst. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung bzw. IB analysiert. Nach Bestimmung der Proteinmenge wurden die geeignetsten Fraktionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.5 Zellkulturmethoden

3.5.1 Kultivierung von HEK293- und MEF-Zellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS, engl. *fetal bovine serum*), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Je nach Resistenz der jeweiligen Zelllinie (vgl. 3.2) wurden 200 µg/ml G418 (Geneticin, Invitrogen) und/oder 200 µg/ml Zeocin (Invitrogen) als Selektionsantibiotikum zugesetzt.

MEF-Zellen wurden ohne Zugabe von G418 oder Zeocin in supplementiertem DMEM kultiviert.

3.5.2 Transiente und stabile Transfektion

Transiente Transfektion

Zur Transfektion von HEK293- bzw. MEF-Zellen mit Lipofectamin®2000 (Invitrogen) wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion etwa 70-80 % konfluent waren. Vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt (DMEM ohne Selektionsantibiotika). Für die Transfektion einer 10 cm-Schale wurden 40 µl Lipofectamin®2000 (Invitrogen) mit 1 ml OptiMem (Invitrogen) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. 16 µg der zu transfizierenden DNA wurden in 1 ml OptiMem verdünnt, nach 5 min Inkubation mit der Lipofectaminlösung gemischt und weitere 20 min inkubiert. Danach wurde die Mischung vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 8-16 h wurde erneut das Medium gewechselt (DMEM ohne Selektionsantibiotika). Am nächsten Tag (nach 16-18 h) wurde das konditionierte Medium zur Analyse der sekretierten Proteine gesammelt und die Zellen zur Expressionsanalyse geerntet.

Stabile Transfektion

Zur Selektion stabil transfizierter Klone wurden dem Medium beim Mediumwechsel nach 8-16 h Selektionsantibiotika zugegeben. Dabei wurde die doppelte der zur normalen Kultivierung eingesetzten Menge eingesetzt. Im Fall der Transfektion von PS1-Konstrukten (in pcDNA3.1TM/Zeo⁽⁺⁾) wurde Medium mit 400 µg/ml Zeocin verwendet. Nach 16-24 h in Selektionsmedium wurden die Zellen je zweimal 1:4 (für gepoolte Klone), 1:100, 1:200 und 1:500 (zur Selektion von Einzelzellklonen) gesplittet. Zur Selektion von gepoolten Zellklonen wurden die Zellen etwa eine Woche wachsen gelassen und dann weiter kultiviert. Die höher gesplitteten Zellen wurden so lange wachsen gelassen, bis einzelne Kolonien sichtbar waren. Diese wurden einzeln in neue Schalen überführt und weiter kultiviert.

3.5.3 Sammeln der sekretierten Proteine und Behandlung mit GSMs

Um die Proteinsekretion verschiedener Zelllinien zu analysieren, wurden diese so gesplittet, dass sie abends etwa zu 70-80 % konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt (DMEM ohne Selektionsantibiotika; Mengen siehe untenstehende Tabelle) und über Nacht (16-18 h) auf den Zellen gelassen. Am nächsten Tag wurde das konditionierte Medium geerntet. Verbliebene Zellreste wurden abzentrifugiert (16000 g, 4 °C, 10 min) und das konditionierte Medium dann entweder direkt analysiert (z.B. per IB, ELISA, ECL-IA oder Massenspektrometrie) oder bei -20 °C gelagert.

Größe des Zellgefäßes	Menge des Über-Nacht-Mediums
15 cm-Schale	10 ml
10 cm-Schale	5 ml
6er Multititerplatte	1 ml/Näpfchen
24er Multititerplatte	500 µl/ Näpfchen

Zur Analyse der Wirkung verschiedener GSMs auf die Sekretion der Zellen wurde dem für den Mediumwechsel verwendeten Medium die gewünschte Menge GSM bzw. die entsprechende Menge DMSO als Kontrolle zugesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Modulatoren sind zusammen mit ihrem entsprechenden IC₅₀ bezüglich A β ₄₂ in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die Strukturen der Modulatoren sind in Abb. 13 dargestellt.

Modulator	IC ₅₀ für A β ₄₂ in HEK293sw-Zellen
RO-02	15 nM (Ebke <i>et al.</i> 2011)
RO5506284	16 nM (Brendel <i>et al.</i> 2015)
RO7019009	16 nM (Trambauer <i>et al.</i> 2020b)
GSM-1	180 nM (Kretner <i>et al.</i> 2011)

3.6 Proteinbiochemische Methoden

Die folgende Tabelle fasst die hier untersuchten Proteine sowie die dafür genutzte Methode und das entsprechende Ausgangsmaterial zusammen. Die Methoden werden im Folgenden genauer beschrieben.

Untersuchte Proteine	Ausgangsmaterial	Methodik
PS1/2, NCT, Calnexin, APP (FL, AICD, CTFs)	Gesamtzelllysat (STEN)	direkter IB
sekretiertes Gesamt-A β -sAPP	konditioniertes Medium	direkter IB
A β ₃₇ , A β ₃₈ , A β ₃₉ , A β ₄₀ , A β ₄₂ , A β ₄₃	konditioniertes Medium	IP + IB, Massenspektrometrie
PS1/2, C99, Gesamt-A β , AICD	Membranassay	direkter IB
A β ₃₈ , A β ₄₀ , A β ₄₂ , A β ₄₃	konditioniertes Medium	ELISA
A β ₃₇ , A β ₃₈ , A β ₄₀ , A β ₄₂	konditioniertes Medium, Mausgehirn	ECL-IA
Photoquervernetzte C99-Bpa/PS1-Komplexe, C99-Bpa	C99-Bpa/PS1-Bindungsassays	Affinitätsisolierung+ IB

3.6.1 Gesamtzelllysat

PBS	140 mM NaCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 17,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 27 mM KCl; pH 7,4
STEN-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % NP-40

Die analysierten Proteine wurden, falls nicht anders angegeben, in STEN-Lysaten analysiert. Um adhären HEK293- oder MEF-Zellen zu ernten, wurden diese in der Zellkulturschale zuerst mit kaltem PBS gewaschen und danach in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 g, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in dem entsprechenden Lysepuffer inkl. PI (cOmplete, Roche) resuspendiert (500 μ l/konfluente 10 cm-Schale) und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (16000 g, 4 °C, 10 min). Die zu analysierenden Proteine befinden sich im Überstand. Vor der weiteren Analyse wurde der Proteingehalt der Probe mittels Bicinchoninsäure-Assay (Interchim) bestimmt.

3.6.2 Präparation von Membranfraktionen

Hypotonischer Puffer	15 mM Na-Citrat pH 6,4
----------------------	------------------------

Die Zellen wurden, wie in 3.6.1 beschrieben, in PBS abgeschabt und pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in hypotonischem Puffer inkl. PI (cOmplete, Roche) resuspendiert (850 μ l/konfluente 10 cm-Schale). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Suspensionen mit hypotonischem Puffer auf eine OD₆₀₀ von 2 eingestellt. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden erst bei RT dann auf Eis langsam aufgetaut. Danach wurde die Probe zehnmal durch eine 0,6 mm-Kanüle aufgezogen. Nicht lysierte Zellen wurden abzentrifugiert (1000 g, 4 °C, 15 min). Um die Membranen zu

pelletieren wurde der Überstand erneut zentrifugiert (16000 g, 4 °C, 45 min). Die Membranpellets wurden danach entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.6.3 Aktivitätsassays mit CHAPSO-solubilisierten Membranfraktionen

CHAPSO-Citrat-Puffer	1 % CHAPSO; 150 mM Na-Citrat pH 6,4
Citrat-Puffer	150 mM Na-Citrat pH 6,4
2x Assay-Puffer	150 mM Na-Citrat pH 6,4; 1 mg/ml Phosphatidylcholin; 20 mM DTT; 0,2 mg/ml BSA

Zur Herstellung des CHAPSO-Membranlysats wurden die Membranpellets (vgl. 3.6.2) in CHAPSO-Citrat-Puffer inkl. PI (cOmplete, Roche) resuspendiert (100 µl/10 cm-Schale) und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe bei 100000 g für 30 min zentrifugiert um die unlöslichen Bestandteile vom Membranlysatz zu trennen.

Die folgende Tabelle enthält die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für den Aktivitätsassay zur Spaltung von rekombinantem C99:

Reagenz	Menge
CHAPSO-Membranlysatz	5 µl
Citrat-Puffer (+PI)	5 µl
2x Assay-Puffer (+PI)	10 µl
C99	≤ 1 µl
Inhibitor/DMSO	≤ 1 µl

Die finale C99-Konzentration betrug 0,5-2 µM. Die Probe muss soweit vorverdünnt werden, dass die SDS-Konzentration im Assay unter 0,008 % liegt. Für einen aussagekräftigen Assay werden zusätzlich zu den Proben und einer Positivkontrolle (DMSO) noch zwei Negativkontrollen benötigt. Eine Probe wurde, anstatt bei 37 °C, bei 4 °C inkubiert, um die Spaltung durch die γ -Sekretase zu verhindern. Bei einer weiteren wurde die Spaltung von C99 durch die Zugabe von 2 µM des GSI L-685,458 (InSolution™ γ -Secretaseinhibitor X, Merck) inhibiert. Die Proben wurden, exklusive der 4 °C Kontrolle, für 16-18 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss des Assays wurde die Produktion von AICD und A β mittels direktem IB analysiert.

3.6.4 Analyse von sekretiertem A β

3x Laemmli-Harnstoff-Probenpuffer	188 mM Tris-HCl pH 6,8; 6 % SDS; 30 % Glycerin; 7,5 % β -Mercaptoethanol; 6 M Harnstoff; Bromphenolblau
STEN-NaCl	50 mM Tris-HCl pH 7,6; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % NP-40
STEN-SDS	50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 2 mM EDTA; 0,2 % NP-40
STEN-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % NP-40
2x HTB-Probenpuffer	720 mM BisTris; 320 mM Bicin; 2 % SDS; 5 % β -Mercaptoethanol; 30 % Saccharose; Bromphenolblau

Von HEK293sw- bzw. MEF-Zellen sekretiertes A β wurde in konditioniertem Medium analysiert (vgl. 3.5.3). Zur Untersuchung des gesamten sekretierten A β wurde der Überstand direkt mit Laemmli-Harnstoff-Probenpuffer versetzt und per IB analysiert. Um die Zellzahl in

verschiedenen Bedingungen miteinzubeziehen, wurde auf dem gleichen Gel zusätzlich sAPP analysiert. Um die Sekretion von A β in den verschiedenen Bedingungen zu vergleichen, wurde das Verhältnis A β /sAPP gebildet.

Um die einzelnen A β -Spezies zu bestimmen, wurden diese zuerst per IP aufkonzentriert. Dafür wurde dem konditionierten Medium nach der Zentrifugation 2 μ l A β -Antikörper (3552) sowie 18 μ l Protein A-Sepharose (PAS) zugegeben und die Mischung für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Danach wurde die PAS abzentrifugiert (bei jedem Schritt 1000 g, 4 °C, 1 min) und jeweils einmal mit je 1 ml STEN-NaCl, STEN-SDS und STEN-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Schritt wurde die PAS nochmals abzentrifugiert, die komplette Flüssigkeit abgenommen und 20 μ l 1,5x HTB-Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden dann auf ein Harnstoff-Tris-Bicin-Gel geladen und per IB analysiert (vgl. 3.6.6).

3.6.5 Photoaffinitätsmarkierungsassay mit C99-Bpa

CHAPSO-Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM CaCl ₂ ; 5 mM MgCl ₂ ; 1 % CHAPSO
Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM CaCl ₂ ; 5 mM MgCl ₂
Dissoziationspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,5; 500 mM NaCl; 5 mM CaCl ₂ ; 5 mM MgCl ₂ ; 1 % SDS; 2 M Harnstoff
2x Imidazol-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 5 % β - Mercaptoethanol; 4 M Harnstoff; 200 mM Imidazol; Bromphenolblau

PS1 WT oder Mutanten- überexprimierende HEK293sw-Zellen wurden in CHAPSO-Lysepuffer inkl. PI (cOmplete EDTA-free, Roche) resuspendiert und 1 h auf Eis lysiert. Dafür wurden die Zellen einer konfluenten 15 cm-Schale in 300 μ l Lysepuffer aufgenommen. Die Proben wurden kurz zentrifugiert (16000 g, 4 °C, 1 min), um nicht lysierte Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde dann für 90 min bei 100000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dann wurde der Überstand mit Lysepuffer inkl. PI (cOmplete EDTA-free, Roche) auf 0,3 % CHAPSO verdünnt. Dabei wurde das durch die Zelllyse gewonnene Zusatzvolumen berücksichtigt um nicht zu stark zu verdünnen. Ein Teil des Lysats (etwa 20 μ l) wurde als Kontrolle direkt mit 2x Imidazol-Probenpuffer versetzt und später weiter verdünnt (s.u.).

Das aufgereinigte Bpa-markierte C99 (vgl. 3.4.3) wurde schnell bei 37 °C (etwa 1 min) aufgetaut. Dann wurden 1,4 μ l C99 mit 70 μ l Lysat gemischt und 1 h bei 4 °C im Dunkeln geschüttelt. Danach wurde zu den Negativkontrollen, welche nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden, das doppelte Volumen (140 μ l) Dissoziationspuffer gegeben um die Proben zu denaturieren. Die restlichen Proben wurden auf Eis für 30 min mit 365 nm bestrahlt. Der Abstand zwischen UV-Lampe und Probe betrug etwa 1 cm. Nach der Bestrahlung wurden auch diese Proben mit 140 μ l Dissoziationspuffer denaturiert. Allen Proben wurden danach 20 μ l Ni-NTA-Agarose (Qiagen) zugegeben, um den His₆-getaggten PS1/C99-Komplex abtrennen zu können. Die Proben wurden für 1 h bei RT geschüttelt. Danach wurde die Agarose bei 2200 g (1 min, RT) abzentrifugiert und

der Überstand verworfen. Die Agarose wurde danach je zweimal mit 140 µl und anschließend je dreimal mit 210 µl Dissoziationspuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit einer Spritze die komplette Flüssigkeit abgenommen und 15 µl 2x Imidazol-Probenpuffer zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Hälfte des Ansatzes auf ein Bis-Tris-Gel geladen und mittels SDS-PAGE und IB analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich verdünntes CHAPSO-Lysat (inkl. 2x Imidazol-Probenpuffer) geladen. Dabei wurden die Proben so verdünnt, dass am Ende 4 %, 1,6 % und 0,32 % der eingesetzten 70 µl geladen wurden. Um die Menge des eingesetzten Bpa-markierten C99 zu kontrollieren wurde 1/10 des Ansatzes auf ein 15 %-Tris-Glycin-Gel geladen und mittels SDS-PAGE und IB analysiert.

3.6.6 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Immunblot

3x Laemmli-Harnstoff-Probenpuffer 188 mM Tris-HCl pH 6,8; 6 % SDS; 30 % Glycerin; 7,5 % β-Mercaptoethanol; 6 M Harnstoff; Bromphenolblau

Bei der Proteinanalyse durch SDS-PAGE wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung wurden die Proteine danach entweder gefärbt oder per IB auf eine Membran transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Verschiedene Gele bzw. Laufpuffer beeinflussen das Trennverhalten der Proteine. Daher wurden unterschiedliche Proteine auf unterschiedlichen Gelen analysiert. Sofern nicht anders angegeben wurden die Proben in Laemmli-Harnstoff-Probenpuffer aufbereitet. Im Folgenden werden die verschiedenen Gel-Systeme kurz beschrieben.

Tris-Glycin-Harnstoff-Gele

4x Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS
4x Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS
Tris-Glycin-Laufpuffer 25 mM Tris-HCl; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS

12 % Tris-Glycin-Harnstoff-Gele wurden genutzt, um PS1/2 und Calnexin zu untersuchen. Die folgende Tabelle enthält die Mengenangaben für jeweils 2 Gele.

Reagenz	12 % Trenngel	Sammelgel
8 M Harnstoff	6,8 ml	2,5 ml
H ₂ O	2,9 ml	0,9 ml
4x Trenngelpuffer	5,85 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Acryl-/Bisacrylamid (37,5:1; 40 %)	4,9 ml	0,5 ml
10 % APS	45 µl	15 µl
TEMED	45 µl	15 µl

Tris-Glycin-Gele

Tris-Glycin-Gele wurden genutzt, um NCT und rekombinantes C99 zu analysieren. Zur besseren Trennung von glykosyliertem und nicht-glykosyliertem NCT wurde es auf 8 %-Gelen analysiert, während für C99 15 %-Gele genutzt wurden. Die Mengenangaben in der folgenden Tabelle sind ausreichend für jeweils 2 Gele.

Reagenz	8 % Trenngel	15 % Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	12,9 ml	8,8 ml	3,4 ml
4x Trenngelpuffer	5,6 ml	5,85 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	1,25 ml
Acryl-/Bisacrylamid (37,5:1; 40 %)	4,7 ml	8,8 ml	0,5 ml
10 % APS	45 µl	45 µl	15 µl
TEMED	45 µl	45 µl	15 µl

Tris-Tricin-Gele (10-20 %, Invitrogen)

Tris-Tricin-Laufpuffer 100 mM Tris; 100 mM Tricin; 0,1 % SDS

Die kommerziellen Tris-Tricin-Gradientengele wurden genutzt, um kleine Proteine wie AICD und A β zu analysieren oder wenn eine große Bandbreite von Proteingrößen auf einem Gel untersucht werden sollte.

Bis-Tris-Gele (10 %, Invitrogen)

MOPS-Laufpuffer 50 mM Tris; 50 mM MOPS pH 7,7; 0,1 % SDS; 1 mM EDTA

Zur Analyse der photoquervernetzten PS1/C99-Bpa-Komplexe wurden kommerzielle 10 % Bis-Tris-Gele verwendet. Da bei diesen Gelen die Wahl des Laufpuffers Auswirkungen darauf hat in welchem Größenbereich die Proteine am besten aufgetrennt werden, wurde für die Analyse der 50-70 kDa großen Komplexe MOPS-Laufpuffer verwendet.

Harnstoff-Tris-Bicin-Gele (nach Wiltfang)

Trenngelpuffer	1,6 M Tris; 400 mM H ₂ SO ₄
Spacergelpuffer	800 mM Bis-Tris; 400 mM H ₂ SO ₄
Sammelgelpuffer	720 mM Bis-Tris; 320 mM Bicin
Kathodenpuffer	200 mM Bicin; 100 mM NaOH; 0,25 % SDS
Anodenpuffer	200 mM Tris; 50 mM H ₂ SO ₄
2x HTB-Probenpuffer	720 mM BisTris; 320 mM Bicin; 2 % SDS; 5 % β -Mercaptoethanol; 30 % Saccharose; Bromphenolblau

Modifizierte Harnstoff-Tris-Bicin-Gele (Wiltfang *et al.* 1997) wurden zur Trennung der einzelnen A β -Spezies verwendet. Je geringer die Acrylamid-Konzentration war, desto besser wurden die Spezies untereinander aufgetrennt. Um A $\beta_{42/43}$ auftrennen zu können, wurden Gele mit 8,5%igem

Trenngel verwendet. Zur Analyse auf Harnstoff-Tris-Bicin-Gelen wurden die Proben in HTB-Probenpuffer vorbereitet. Das Sammelgel wurde 1,2 cm hoch, das Spacergel 1,3 cm hoch gegossen. Die Tabelle enthält die Mengenangaben für zwei Gele.

Reagenz	Trenngel (8.5 %)	Spacergel	Sammelgel
Harnstoff	9,6 g	-	-
H ₂ O	3,25 ml	1,36 ml	0,81 ml
Trenngelpuffer	5 ml	-	-
Spacergelpuffer	-	2 ml	
Sammelgelpuffer	-	-	1,5 ml
20 % SDS	100 µl	20 µl	15 µl
Acryl-/Bisacrylamid (19:1; 40 %)	4,25 ml	600 µl	675 µl
10 % APS	80 µl	16 µl	18 µl
TEMED	10 µl	4 µl	18 µl

Immunblot

Tris-Glycin-Blotpuffer	25 mM Tris-HCl; 200 mM Glycin
Blockpuffer	0,2 % I-Block (Tropix); 0,1 % Tween20 in PBS
TBS-Tween-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween20

Beim IB werden die Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Auf dieser Membran können dann die zu analysierenden Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Gele wurden zusammen mit den Membranen für 1 h (400 mA) in einer Blotkammer in Tris-Glycin-Blotpuffer geblottet. Dabei wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Danach wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert. Dann wurde der spezifische primäre Antikörper (vgl. 3.1) in Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben und geschüttelt. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit TBS-Tween-Puffer gewaschen. Der entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in Blockpuffer verdünnt und für 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Die Membran wurde wieder dreimal für 5 min mit TBS-Tween-Puffer gewaschen. Danach wurde das ECL-Substrat (Pierce™ ECL Western-Blotting Substrate, Thermo Scientific) zugegeben und die Signale der HRP auf der Membran per Röntgenfilm oder per CCD Kamera mit dem LAS-4000 Image Reader (Fujifilm Life Sciences) detektiert. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der Software Multi-Gauge (V3.0) analysiert.

Da unterschiedliche Proteine bzw. Epitope teilweise sehr unterschiedlich erkannt wurden, musste die Art der verwendeten Membran variiert werden. So wurden einige Proteine auf PVDF- andere hingegen auf Nitrocellulose-Membranen analysiert. Bei manchen, vor allem kleineren, Proteinen wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Proteintransfer für 4 min in PBS gekocht. Die abschließende Tabelle fasst zusammen welche Proteine auf welchen Gelen, bzw. auf welchen

Membranen analysiert wurden.

Analysiertes Protein	Art des Gels	Art der Membran
PS1/2, Calnexin	12 % Tris-Glycin-Harnstoff-Gel	PVDF oder Nitrocellulose
NCT	Tris-Tricin-Gel (10-20 %)	
	8 % Tris-Glycin-Gel	PVDF oder Nitrocellulose
	Tris-Tricin-Gel (10-20 %)	
APP (FL, AICD, CTFs), sekretiertes Gesamt-A β -sAPP	Tris-Tricin-Gel (10-20 %)	gekochte Nitrocellulose
Getrennte A β -Spezies	Harnstoff-Tris-Bicin-Gele (8,5 %)	gekochte Nitrocellulose
Photoquervernetzte C99-Bpa/PS1-Komplexe,	10 % Bis-Tris-Gel (MOPS Laufpuffer)	gekochte Nitrocellulose
C99, C99-Bpa	15 % Tris-Glycin-Gel	gekochte Nitrocellulose

3.6.7 A β -Quantifizierung mittels Elektrochemilumineszenz-Immunassay

ECL-Blockpuffer	1 % BSA; 0,05 % Tween20 in PBS pH 7,4
ECL-Waschpuffer	0,05 % Tween20 in PBS pH 7,4
Triton-Puffer	0,5 % Triton-X-100 in PBS pH7,4

Die Mengen von A β ₃₇, A β ₃₈, A β ₄₀ und A β ₄₂ in konditioniertem Medium, z.B. zur Bestimmung von IC₅₀-Werten von GSMs, wurden mittels eines Elektrochemilumineszenz-Immunassay (ECL-IA) bestimmt. Die verschiedenen A β -Spezies im Medium wurden zuerst mithilfe eines allgemeinen A β -Antikörpers (2D8-Biotin) an die Platte gebunden. Danach erfolgte die Detektion der Lichtemission nach elektrischer Stimulation eines Ruthenium-Tags am speziesspezifischen Sekundär-antikörper. Der markierte A β ₃₈-Antikörper wurde direkt von MSD bezogen, die Antikörper gegen A β ₃₇, A β ₄₀ (BAP-24) bzw. A β ₄₂ (BAP-15) wurden entsprechend der Herstellerangaben markiert (MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester, MSD).

Mit Streptavidin beschichtete 96er Multititerplatten wurden mit ECL-Blockpuffer geblockt (1 h, RT) und dann über Nacht mit biotinyliertem 2D8-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben 3x je 5 min bei RT mit 100 μ l ECL-Waschpuffer gewaschen. Je 75 μ l konditioniertes Medium wurden zusammen mit 25 μ l des jeweiligen in ECL-Blockpuffer verdünntem speziesspezifischen Antikörpers 2 h bei RT geschüttelt. Danach wurden die Proben erneut 3x je 5 min mit 100 μ l ECL-Waschpuffer gewaschen. Zur Analyse wurden 100 μ l Lesepuffer (MSD) zugegeben und die Proben auf einem MSD Sector Imager 2400 Reader gemessen.

Konditioniertes Medium von HEK293sw bzw. PS1-überexprimierenden Zellen wurde in der Regel unverdünnt gemessen. Zur Analyse der A β -Spezies aus zellfreien Aktivitätsassays (siehe 3.6.3) wurden die Proben 1:25 in Triton-Puffer verdünnt. Die A β -Standards wurden entsprechend der jeweiligen Charge verdünnt (siehe untenstehende Tabelle). Ausgehend von dieser höchsten Konzentration wurden durch eine 1:3-Verdünnungsreihe sieben verschiedene Standardkonzentrationen vorbereitet. Im Fall von Zellkulturmedium wurden die A β -Standards in dem für

die Zellen genutzten DMEM verdünnt. Bei der Analyse von Aktivitätsassays wurden die Standards in dem für die Verdünnung der Proben genutzten Triton-Puffer verdünnt. Zur Bestimmung von A β ₄₃ wurden die Proben mittels ELISA analysiert (siehe 3.6.8). Für die Quantifizierung von A β aus Mausgehirn siehe 3.6.9.

A β -Spezies	Höchste Standardkonzentration
A β ₃₇	7000 pg/ml
A β ₃₈	12000 pg/ml
A β ₄₀	20000 pg/ml
A β ₄₂	18000 pg/ml

3.6.8 A β -Quantifizierung mittels ELISA

Für die quantitative Analyse von A β ₃₈, A β ₄₀, A β ₄₂ und A β ₄₃ aus konditioniertem Medium wurden kommerzielle speziesspezifische A β -ELISAs (IBL) verwendet. Durch die hohe Sensitivität des Systems mussten die Proben teils sehr stark verdünnt werden (1:10 – 1:2000 in Assaypuffer des Herstellers). Da die unterschiedlichen untersuchten PS1-Mutanten sehr unterschiedliche Mengen der einzelnen A β -Spezies produzieren, wurden, anders als beim ECL-IA, zur Analyse der einzelnen Spezies teils unterschiedliche Verdünnungen genutzt um im linearen Bereich des ELISAs zu bleiben.

Die Messungen wurden wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. 100 μ l entsprechend verdünntes konditioniertes Medium wurde über Nacht bei 4 °C auf mit speziesspezifischen Antikörpern beschichteten Platten inkubiert um die jeweilige A β -Spezies zu binden. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der enzymgekoppelte Sekundärantikörper dazugegeben und 1 h bei RT abgedeckt geschüttelt. Die farbgebende Reaktion wurde mit Stopp-Lösung angehalten und die Absorption der Proben bei 450 nm gemessen.

3.6.9 Sequenzielle A β -Extraktion aus Mausgehirn

DEA-Puffer	1 % Diethylamin; 50 mM NaCl
Harnstoff-Puffer	9 M Harnstoff; 50 mM Tris-HCl pH 7,4
Assaypuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 60 mM NaCl
ECL-Blockpuffer 2	5 % BSA; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 60 mM NaCl; 0,1 % Tween20
ECL-Waschpuffer 2	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 60 mM NaCl; 0,1 % Tween20

Die bei -80 °C eingefrorene Gehirnhemisphäre wurde im neunfachen Volumen DEA-Puffer (inkl. PI, cOmplete, Roche) homogenisiert, 3 h auf Eis inkubiert und danach 1 h bei 100000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Um das unlösliche A β zu extrahieren wurde das Pellet in 1 ml Harnstoff-Puffer resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde 1 h bei 100000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert.

A β ₃₈, A β ₄₀ und A β ₄₂ in der löslichen (DEA) bzw. unlöslichen (Harnstoff) Fraktion wurden mittels ECL-IA (vgl. 3.6.7) bestimmt. Anstatt der dort beschriebenen Block- und Waschpuffer wurden die hier beschriebenen verwendet. Die Proben der Harnstoff-Fraktion wurden vor der Messung 1:10 mit Assaypuffer verdünnt. Die A β -Standards (vgl. 3.6.7) wurden in Assaypuffer mit 10 % Harnstoff-Puffer und 6 % FBS verdünnt.

3.6.10 A β -Analyse mittels Massenspektrometrie

TE-MS-Puffer	125 mM EDTA; 750 mM Tris-HCl pH 8
IP-MS-Puffer	140 mM NaCl; 0,1 % N-octyl-Glycopyranosid; 10 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM EDTA
MS-Matrix	50 % Acetonitril, 0,3 % Trichloressigsäure in H ₂ O; gesättigt mit α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure

Zur Analyse der A β -Sekretion von PS1-Mutanten mit normaler Aktivität wurde 1 ml konditioniertes Medium einer 10 cm-Schale genutzt, bei Mutanten mit Aktivitätsverlust wurde das komplette Medium einer 10 cm-Schale verwendet. Dem konditionierten Medium wurden 40 μ l/ml TE-MS-Puffer zugesetzt. Für die IP von A β wurden 15 μ l Protein G-Sepharose (PGS) und 5 μ l 4G8 Antikörper zugesetzt und für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die PGS wurde 3x mit je 1 ml IP-MS-Puffer und danach 3x mit je 1 ml ddH₂O gewaschen (dazwischen jeweils Zentrifugation bei 1000 g, 4 °C, 1 min). Nach dem letzten Waschschrift wurde mit einer Spritze die komplette Flüssigkeit entfernt. Danach wurde die Probe bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Vor der Analyse wurde die MS-Matrix vorbereitet. Dafür wurde 0,6%ige Trichloressigsäure 1:2 mit Acetonitril verdünnt. Der Mischung wurde eine Spatelspitze α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure zugegeben. Dann wurde die Mischung 10 min bei 37 °C geschüttelt, um eine gesättigte Lösung herzustellen. Nach Ende der Inkubation wurde die nicht gelöste Zimtsäure abzentrifugiert. 10 μ l der MS-Matrix wurden auf die PGS gegeben und kurz vermischt um die A β -Peptide zu eluieren. Die Sepharose wurde kurz abzentrifugiert. Danach wurden 3x je 0,4 μ l des Überstands auf eine MALDI-Stahlplatte pipettiert. Die Proben wurden dann auf einem 4800 MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX) gemessen und mit der Software DataExplorer™ (V4.8, Applied Biosystems) analysiert.

Literatur

- Acx H, Chavez-Gutierrez L, Serneels L, Lismont S, Benurwar M, Elad N & De Strooper B (2014). »Signature amyloid β profiles are produced by different γ -secretase complexes.« J Biol Chem **289**(7): 4346-4355.
- Ahn JE, Carrieri C, Dela Cruz F, Fullerton T, Hajos-Korcsok E, He P, ... Qiu R (2020). »Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of a γ -secretase modulator, PF-06648671, on CSF amyloid- β peptides in randomized phase I studies.« Clin Pharmacol Ther **107**(1): 211-220.
- Albright CF, Dockens RC, Meredith JE, Jr., Olson RE, Slemmon R, Lentz KA, ... Tong G (2013). »Pharmacodynamics of selective inhibition of γ -secretase by avagacestat.« J Pharmacol Exp Ther **344**(3): 686-695.
- Alzforum Mutations Database.
- Alzheimer's Association (2018). »2018 Alzheimer's disease facts and figures.« Alzheimers Dement **14**(3): 367-429.
- Alzheimer A (1907). »Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde « Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin(64): 146-148.
- Alzheimer A (1911). »Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters.« Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie **4**(1): 356.
- Alzheimer Europe. (2013a). »EuroCoDe: prevalence of dementia in Europe.« abgerufen am 05.11.2019 unter: <https://www.alzheimer-europe.org/EN/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe>.
- Alzheimer Europe. (2013b). »EuroCoDe: the prevalence of dementia in Europe/Germany.« abgerufen am 05.11.2019 unter: <https://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe/Germany>.
- Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, ... Willnow TE (2005). »Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein.« Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13461-13466.
- Andersson ER & Lendahl U (2014). »Therapeutic modulation of notch signalling - are we there yet?« Nat Rev Drug Discov **13**(5): 357-378.
- Arboleda-Velasquez JF, Lopera F, O'Hare M, Delgado-Tirado S, Marino C, Chmielewska N, ... Quiroz YT (2019). »Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report.« Nature Med.
- Arndt JW, Qian F, Smith BA, Quan C, Kilambi KP, Bush MW, ... Weinreb PH (2018). »Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid- β .« Sci Rep **8**(1): 6412.
- Bai XC, Rajendra E, Yang G, Shi Y & Scheres SH (2015a). »Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human γ -secretase.« Elife **4**.
- Bai XC, Yan C, Yang G, Lu P, Ma D, Sun L, ... Shi Y (2015b). »An atomic structure of human γ -secretase.« Nature **525**(7568): 212-217.
- Barker WW, Luis CA, Kashuba A, Luis M, Harwood DG, Loewenstein D, ... Duara R (2002). »Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank.« Alzheimer Dis Assoc Disord **16**(4): 203-212.
- Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, ... Sanders CR (2012). »The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol.« Science **336**(6085): 1168-1171.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, ... Morris JC (2012). »Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease.« N Engl J Med **367**(9): 795-804.
- Beel AJ & Sanders CR (2008). »Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases.« Cell Mol Life Sci **65**(9): 1311-1334.
- Behr D, Clarke EE, Wrigley JD, Martin AC, Nadin A, Churcher I & Shearman MS (2004). »Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target γ -secretase at a novel site: evidence for an allosteric mechanism.« J Biol Chem **279**(42): 43419-43426.
- Benilova I, Gallardo R, Ungureanu AA, Castillo Cano V, Snellinx A, Ramakers M, ... De Strooper B (2014). »The Alzheimer disease protective mutation A2T modulates kinetic and thermodynamic properties of amyloid- β (A β) aggregation.« J Biol Chem **289**(45): 30977-30989.
- Bertrand E, Brouillet E, Caille I, Bouillot C, Cole GM, Prochiantz A & Allinquant B (2001). »A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis *in vitro* and *in vivo*.« Mol Cell Neurosci **18**(5): 503-511.

- Bien J, Jefferson T, Causevic M, Jumpertz T, Munter L, Multhaup G, ... Pietrzik CU (2012). »The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species.« J Biol Chem 287(40): 33304-33313.
- Biogen. (2019a). »Biogen plant Zulassungsantrag für Aducanumab bei Alzheimer auf der Grundlage einer neuen Analyse eines größeren Datensatzes aus Phase-3-Studien.« abgerufen am 06.11.2019 unter: https://www.biogen.de/de_DE/news-insights/germanyaffiliatenews/22-10-2019-news.html.
- Biogen. (2019b). »Biogen und Eisai brechen Phase-III-Studien ENGAGE und EMERGE zu Aducanumab bei Alzheimer-Krankheit ab.« abgerufen am 06.11.2019 unter: https://www.biogen.de/de_DE/news-insights/germanyaffiliatenews/21-03-2019-news.html.
- Bolduc DM, Montagna DR, Gu Y, Selkoe DJ & Wolfe MS (2016a). »Nicastrin functions to sterically hinder γ -secretase-substrate interactions driven by substrate transmembrane domain.« Proc Natl Acad Sci U S A 113(5): E509-518.
- Bolduc DM, Montagna DR, Seghers MC, Wolfe MS & Selkoe DJ (2016b). »The amyloid- β forming tripeptide cleavage mechanism of γ -secretase.« Elife 5.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, ... Sisodia SS (1996). »Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*.« Neuron 17(5): 1005-1013.
- Borgegard T, Jureus A, Olsson F, Rosqvist S, Sabirsh A, Rotticci D, ... Lundkvist J (2012). »First and second generation γ -secretase modulators (GSMs) modulate amyloid- β (A β) peptide production through different mechanisms.« J Biol Chem 287(15): 11810-11819.
- Botev A, Munter LM, Wenzel R, Richter L, Althoff V, Ismer J, ... Multhaup G (2011). »The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds γ -secretase modulators.« Biochemistry 50(5): 828-835.
- Boyartchuk VL, Ashby MN & Rine J (1997). »Modulation of ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis.« Science 275(5307): 1796-1800.
- Braak H & Braak E (1991). »Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.« Acta Neuropathol 82(4): 239-259.
- Brendel M, Jaworska A, Herms J, Trambauer J, Rotzer C, Gildehaus FJ, ... Rominger A (2015). »Amyloid-PET predicts inhibition of de novo plaque formation upon chronic γ -secretase modulator treatment.« Mol Psychiatry 20(10): 1179-1187.
- Brockhaus M, Grunberg J, Rohrig S, Loetscher H, Wittenburg N, Baumeister R, ... Haass C (1998). »Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling.« Neuroreport 9(7): 1481-1486.
- Brothers HM, Gosztyla ML & Robinson SR (2018). »The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease.« Front Aging Neurosci 10: 118.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB & Goldstein JL (2000). »Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans.« Cell 100(4): 391-398.
- Bukhari H, Glotzbach A, Kolbe K, Leonhardt G, Loosse C & Muller T (2017). »Small things matter: implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease.« Prog Neurobiol 156: 189-213.
- Burnouf S, Gorsky MK, Dols J, Gronke S & Partridge L (2015). »A β 43 is neurotoxic and primes aggregation of A β 40 *in vivo*.« Acta Neuropathol 130(1): 35-47.
- Bursavich MG, Harrison BA & Blain JF (2016). » γ -Secretase modulators: new Alzheimer's drugs on the horizon?« J Med Chem 59(16): 7389-7409.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J & Yankner BA (1995). » β -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding.« Neuron 14(4): 879-888.
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, ... Masters CL (1993). »A novel zinc(II) binding site modulates the function of the β A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease.« J Biol Chem 268(22): 16109-16112.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, ... Black RA (1998). »Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor.« J Biol Chem 273(43): 27765-27767.
- Cai T, Yonaga M & Tomita T (2017). »Activation of γ -secretase trimming activity by topological changes of transmembrane domain 1 of presenilin 1.« J Neurosci 37(50): 12272-12280.
- Cao X & Sudhof TC (2001). »A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60.« Science 293(5527): 115-120.
- Capell A, Behr D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS & Haass C (2005). » γ -Secretase complex assembly within the early secretory pathway.« J Biol Chem 280(8): 6471-6478.

- Capell A, Saffrich R, Olivo JC, Meyn L, Walter J, Grunberg J, ... Haass C (1997). »Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation.« *J Neurochem* **69**(6): 2432-2440.
- Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, ... Holtzman DM (2011). »Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance.« *Sci Transl Med* **3**(89): 89ra57.
- Chan EY & McQuibban GA (2013). »The mitochondrial rhomboid protease: its rise from obscurity to the pinnacle of disease-relevant genes.« *Biochim Biophys Acta* **1828**(12): 2916-2925.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, ... et al. (1991). »Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene.« *Nature* **353**(6347): 844-846.
- Chau DM, Crump CJ, Villa JC, Scheinberg DA & Li YM (2012). »Familial Alzheimer disease presenilin-1 mutations alter the active site conformation of γ -secretase.« *J Biol Chem* **287**(21): 17288-17296.
- Chavez-Gutierrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, ... De Strooper B (2012). »The mechanism of γ -secretase dysfunction in familial Alzheimer disease.« *EMBO J* **31**(10): 2261-2274.
- Chavez-Gutierrez L, Tolia A, Maes E, Li T, Wong PC & de Strooper B (2008). »Glu332 in the nicastrin ectodomain is essential for γ -secretase complex maturation but not for its activity.« *J Biol Chem* **283**(29): 20096-20105.
- Chen AC, Kim S, Shepardson N, Patel S, Hong S & Selkoe DJ (2015). »Physical and functional interaction between the α - and γ -secretases: a new model of regulated intramembrane proteolysis.« *J Cell Biol* **211**(6): 1157-1176.
- Chen CY, Malchus NS, Hehn B, Stelzer W, Avci D, Langosch D & Lemberg MK (2014). »Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u.« *EMBO J* **33**(21): 2492-2506.
- Cheng H, Vetrivel KS, Drisdell RC, Meckler X, Gong P, Leem JY, ... Thinakaran G (2009). »S-palmitoylation of γ -secretase subunits nicastrin and APH-1.« *J Biol Chem* **284**(3): 1373-1384.
- Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L & Schultz PG (2002). »Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11020-11024.
- Chyung JH, Raper DM & Selkoe DJ (2005). » γ -Secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage.« *J Biol Chem* **280**(6): 4383-4392.
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, ... Holtzman DM (2008). »Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β *in vivo*.« *Neuron* **58**(1): 42-51.
- Citron M, Diehl TS, Capell A, Haass C, Teplow DB & Selkoe DJ (1996). »Inhibition of amyloid β -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF.« *Neuron* **17**(1): 171-179.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, ... Selkoe DJ (1992). »Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production.« *Nature* **360**(6405): 672-674.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, ... Selkoe DJ (1997). »Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice.« *Nat Med* **3**(1): 67-72.
- Clarke EE, Churcher I, Ellis S, Wrigley JD, Lewis HD, Harrison T, ... Behr D (2006). »Intra- or intercomplex binding to the γ -secretase enzyme: a model to differentiate inhibitor classes.« *J Biol Chem* **281**(42): 31279-31289.
- Congdon EE & Sigurdsson EM (2018). »Tau-targeting therapies for Alzheimer disease.« *Nat Rev Neurol* **14**(7): 399-415.
- Conlon RA, Reaume AG & Rossant J (1995). »Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites.« *Development* **121**(5): 1533-1545.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, ... Pericak-Vance MA (1993). »Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.« *Science* **261**(5123): 921-923.
- Coric V, van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW, ... Berman RM (2012). »Safety and tolerability of the γ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease.« *Arch Neurol* **69**(11): 1430-1440.
- Crump CJ, Castro SV, Wang F, Pozdnyakov N, Ballard TE, Sisodia SS, ... Li YM (2012). »BMS-708,163 targets presenilin and lacks notch-sparing activity.« *Biochemistry* **51**(37): 7209-7211.
- Crump CJ, Fish BA, Castro SV, Chau DM, Gertsik N, Ahn K, ... Li YM (2011). »Piperidine acetic acid based γ -secretase modulators directly bind to presenilin-1.« *ACS Chem Neurosci* **2**(12): 705-710.

- Crump CJ, Johnson DS & Li YM (2013). »Development and mechanism of γ -secretase modulators for Alzheimer's disease.« *Biochemistry* **52**(19): 3197-3216.
- Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, Annaert W & De Strooper B (2001). »The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by γ -secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture.« *J Neurochem* **78**(5): 1168-1178.
- Cusulin C, Wells I, Badillo S, Duran-Pacheco GC, Baumann K & Patsch C (2019). » γ -Secretase modulators and BACE inhibitors reduce A β production without altering gene expression in Alzheimer's disease iPSC-derived neurons and mice.« *Mol Cell Neurosci* **100**: 103392.
- Czirr E, Leuchtenberger S, Dorner-Ciossek C, Schneider A, Jucker M, Koo EH, ... Weggen S (2007). »Insensitivity to A β 42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and γ -secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations.« *J Biol Chem* **282**(34): 24504-24513.
- Das U, Scott DA, Ganguly A, Koo EH, Tang Y & Roy S (2013). »Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway.« *Neuron* **79**(3): 447-460.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, ... Sirinathsinghji DJ (1999). »Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein.« *Neuroscience* **90**(1): 1-13.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, ... Kopan R (1999). »A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of notch intracellular domain.« *Nature* **398**(6727): 518-522.
- DeKosky ST & Scheff SW (1990). »Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity.« *Ann Neurol* **27**(5): 457-464.
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, Giaccone G, Moro ML, Ghidoni R, ... Tagliavini F (2012). »Good gene, bad gene: new APP variant may be both.« *Prog Neurobiol* **99**(3): 281-292.
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S, Mazzoleni G, ... Tagliavini F (2009). »A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis.« *Science* **323**(5920): 1473-1477.
- Dimitrov M, Alattia J-R, Lemmin T, Lehal R, Fligier A, Houacine J, ... Fraering PC (2013). »Alzheimer's disease mutations in APP but not γ -secretase modulators affect ϵ -cleavage-dependent AICD production.« *Nat Commun* **4**: 2246.
- Doerfler P, Shearman MS & Perlmutter RM (2001). »Presenilin-dependent γ -secretase activity modulates thymocyte development.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9312-9317.
- Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, ... Mohs R (2013). »A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease.« *N Engl J Med* **369**(4): 341-350.
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, ... Audia JE (2001). »Functional γ -secretase inhibitors reduce β -amyloid peptide levels in brain.« *J Neurochem* **76**(1): 173-181.
- Dries DR, Shah S, Han YH, Yu C, Yu S, Shearman MS & Yu G (2009). »Glu-333 of nicastrin directly participates in γ -secretase activity.« *J Biol Chem* **284**(43): 29714-29724.
- Dries DR & Yu G (2008). »Assembly, maturation, and trafficking of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease.« *Curr Alzheimer Res* **5**(2): 132-146.
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, ... Beyreuther K (1988). »Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease.« *EMBO J* **7**(4): 949-957.
- Ebke A, Luebbbers T, Fukumori A, Shirotani K, Haass C, Baumann K & Steiner H (2011). »Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein.« *J Biol Chem* **286**(43): 37181-37186.
- Edbauer D, Winkler E, Haass C & Steiner H (2002). »Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation.« *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(13): 8666-8671.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H & Haass C (2003). »Reconstitution of γ -secretase activity.« *Nat Cell Biol* **5**(5): 486-488.
- Egan MF, Kost J, Tariot PN, Aisen PS, Cummings JL, Vellas B, ... Michelson D (2018). »Randomized trial of verubecestat for mild-to-moderate Alzheimer's disease.« *N Engl J Med* **378**(18): 1691-1703.
- Egan MF, Kost J, Voss T, Mukai Y, Aisen PS, Cummings JL, ... Michelson D (2019). »Randomized trial of verubecestat for prodromal Alzheimer's disease.« *N Engl J Med* **380**(15): 1408-1420.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C & Simons K (2003). »Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts.« *J Cell Biol* **160**(1): 113-123.
- Elad N, De Strooper B, Lismont S, Hagen W, Veugelen S, Arimon M, ... Chavez-Gutierrez L (2015). »The dynamic conformational landscape of γ -secretase.« *J Cell Sci* **128**(3): 589-598.

- Eli Lilly, Company & AstraZeneca (2018). A study of lanabecestat (LY3314814) in participants with mild Alzheimer's disease dementia.
- Erez E, Fass D & Bibi E (2009). »How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane.« *Nature* **459**(7245): 371-378.
- Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, ... Golde TE (2003). »NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 *in vivo*.« *J Clin Invest* **112**(3): 440-449.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, ... Ward PJ (1990). »Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor.« *Science* **248**(4959): 1122-1124.
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM & Brody DL (2013). »Amyloid- β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls.« *Ann Neurol* **73**(1): 104-119.
- Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, ... et al. (1992). »Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor.« *Science* **255**(5045): 726-728.
- Fernandez MA, Klutkowski JA, Freret T & Wolfe MS (2014). »Alzheimer presenilin-1 mutations dramatically reduce trimming of long amyloid β -peptides (A β) by γ -secretase to increase 42-to-40-residue A β .« *J Biol Chem* **289**(45): 31043-31052.
- Filser S, Ovsepian SV, Masana M, Blazquez-Llorca L, Brandt Elvang A, Volbracht C, ... Herms J (2015). »Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions.« *Biol Psychiatry* **77**(8): 729-739.
- Findeis MA, Schroeder F, McKee TD, Yager D, Fraering PC, Creaser SP, ... Eckman CB (2012). »Discovery of a novel pharmacological and structural class of γ -secretase modulators derived from the extract of *Actaea racemosa*.« *ACS Chem Neurosci* **3**(11): 941-951.
- Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Kaltak L & Lemberg MK (2012). »Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins.« *Mol Cell* **47**(4): 558-569.
- Fleisher AS, Raman R, Siemers ER, Becerra L, Clark CM, Dean RA, ... Thal LJ (2008). »Phase 2 safety trial targeting amyloid β production with a γ -secretase inhibitor in Alzheimer disease.« *Arch Neurol* **65**(8): 1031-1038.
- Fraering PC, LaVoie MJ, Ye W, Ostaszewski BL, Kimberly WT, Selkoe DJ & Wolfe MS (2004). »Detergent-dependent dissociation of active γ -secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex.« *Biochemistry* **43**(2): 323-333.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, ... Curtis D (2002). »*aph-1* and *pen-2* are required for notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation.« *Dev Cell* **3**(1): 85-97.
- Fukumori A & Steiner H (2016). »Substrate recruitment of γ -secretase and mechanism of clinical presenilin mutations revealed by photoaffinity mapping.« *EMBO J* **35**(15): 1628-1643.
- Fuller NO, Hubbs JL, Austin WF, Creaser SP, McKee TD, Loureiro RM, ... Bronk BS (2012). »Initial optimization of a new series of γ -secretase modulators derived from a triterpene glycoside.« *ACS Med Chem Lett* **3**(11): 908-913.
- Funamoto S, Sasaki T, Ishihara S, Nobuhara M, Nakano M, Watanabe-Takahashi M, ... Ihara Y (2013). »Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of γ -secretase.« *Nat Commun* **4**: 2529.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, ... Mattson MP (1996). »Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain.« *J Neurochem* **67**(5): 1882-1896.
- Galasko DR, Graff-Radford N, May S, Hendrix S, Cottrell BA, Sagi SA, ... Koo EH (2007). »Safety, tolerability, pharmacokinetics, and A β levels after short-term administration of R-flurbiprofen in healthy elderly individuals.« *Alzheimer Dis Assoc Disord* **21**(4): 292-299.
- Garcia-Osta A & Alberini CM (2009). »Amyloid β mediates memory formation.« *Learn Mem* **16**(4): 267-272.
- GBD 2016 Dementia Collaborators (2019). »Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.« *Lancet Neurol* **18**(1): 88-106.
- Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L & Haass C (2002). »A γ -secretase inhibitor blocks notch signaling *in vivo* and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish.« *EMBO Rep* **3**(7): 688-694.
- Gijsen HJ & Mercken M (2012). » γ -Secretase modulators: can we combine potency with safety?« *Int J Alzheimers Dis* **2012**: 295207.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, ... Orgogozo JM (2005). »Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial.« *Neurology* **64**(9): 1553-1562.
- Glenner GG & Wong CW (1984). »Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein.« *Biochem Biophys Res Commun* **122**(3): 1131-1135.

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, ... et al. (1991). »Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.« Nature **349**(6311): 704-706.
- Godbolt AK, Cipolotti L, Watt H, Fox NC, Janssen JC & Rossor MN (2004). »The natural history of Alzheimer disease: a longitudinal presymptomatic and symptomatic study of a familial cohort.« JAMA Neurol **61**(11): 1743-1748.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE & Klug A (1988). »Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau.« Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 4051-4055.
- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ & Younkin SG (1992). »Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives.« Science **255**(5045): 728-730.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U & Gajdusek DC (1987). »Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease.« Science **235**(4791): 877-880.
- Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA & Priess JR (2002). »APH-1 is a multipass membrane protein essential for the notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos.« Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 775-779.
- Gratuze M, Leyns CEG & Holtzman DM (2018). »New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease.« Mol Neurodegener **13**(1): 66.
- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA & Zavitz KH (2009). »Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial.« JAMA **302**(23): 2557-2564.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS & Wisniewski HM (1986). »Microtubule-associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments.« J Biol Chem **261**(13): 6084-6089.
- Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, Hasegawa H, Duthie M, ... St George-Hyslop P (2003). »APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes.« J Biol Chem **278**(9): 7374-7380.
- Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K & Ihara Y (2001). »Distinct intramembrane cleavage of the β -amyloid precursor protein family resembling γ -secretase-like cleavage of notch.« J Biol Chem **276**(38): 35235-35238.
- Haapasalo A & Kovacs DM (2011). »The many substrates of presenilin/ γ -secretase.« J Alzheimers Dis **25**(1): 3-28.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB & Selkoe DJ (1993). » β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms.« J Biol Chem **268**(5): 3021-3024.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G & Sisodia S (2012). »Trafficking and proteolytic processing of APP.« Cold Spring Harb Perspect Med **2**(5): a006270.
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY & Selkoe DJ (1992a). »Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments.« Nature **357**(6378): 500-503.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, ... Selkoe DJ (1995). »The swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway.« Nat Med **1**(12): 1291-1296.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, ... et al. (1992b). »Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.« Nature **359**(6393): 322-325.
- Haass C & Selkoe DJ (1993). »Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide.« Cell **75**(6): 1039-1042.
- Hadland BK, Manley NR, Su D, Longmore GD, Moore CL, Wolfe MS, ... Kopan R (2001). » γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development.« Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7487-7491.
- Hahn S, Bruning T, Ness J, Czirr E, Baches S, Gijzen H, ... Weggen S (2011). »Presenilin-1 but not amyloid precursor protein mutations present in mouse models of Alzheimer's disease attenuate the response of cultured cells to γ -secretase modulators regardless of their potency and structure.« J Neurochem **116**(3): 385-395.
- Hardy JA & Higgins GA (1992). »Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.« Science **256**(5054): 184-185.
- Hasegawa H, Sanjo N, Chen F, Gu YJ, Shier C, Petit A, ... St George-Hyslop P (2004). »Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes.« J Biol Chem **279**(45): 46455-46463.

- Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, ... Hyman BT (2012). »Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, Increases the oligomerization of amyloid β peptide.« *J Neurosci* **32**(43): 15181-15192.
- Hatami A, Monjazeb S, Milton S & Glabe CG (2017). »Familial Alzheimer's Disease mutations within the amyloid precursor protein alter the aggregation and conformation of the amyloid- β peptide.« *J Biol Chem* **292**(8): 3172-3185.
- Hebert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horre K, Dabrowski M, Baert V, ... De Strooper B (2004). »Coordinated and widespread expression of γ -secretase *in vivo*: evidence for size and molecular heterogeneity.« *Neurobiol Dis* **17**(2): 260-272.
- Hebert SS, Serneels L, Tolia A, Craessaerts K, Derks C, Filippov MA, ... De Strooper B (2006). »Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes.« *EMBO Rep* **7**(7): 739-745.
- Heilig EA, Gutt U, Tai T, Shen J & Kelleher RJ, 3rd (2013). »Trans-dominant negative effects of pathogenic *PSEN1* mutations on γ -secretase activity and A β production.« *J Neurosci* **33**(28): 11606-11617.
- Heilig EA, Xia W, Shen J & Kelleher RJ, 3rd (2010). »A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of γ -secretase activity.« *J Biol Chem* **285**(29): 22350-22359.
- Henley D, Raghavan N, Sperling R, Aisen P, Raman R & Romano G (2019). »Preliminary results of a trial of atabecestat in preclinical Alzheimer's disease.« *N Engl J Med* **380**(15): 1483-1485.
- Henstridge CM, Hyman BT & Spire-Jones TL (2019). »Beyond the neuron-cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis.« *Nat Rev Neurosci* **20**(2): 94-108.
- Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, ... De Strooper B (1999). »Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11872-11877.
- Herreman A, Van Gassen G, Bentahir M, Nyabi O, Craessaerts K, Mueller U, ... De Strooper B (2003). » γ -Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation.« *J Cell Sci* **116**(Pt 6): 1127-1136.
- Hitzenberger M & Zacharias M (2019). »Uncovering the binding mode of γ -secretase inhibitors.« *ACS Chem Neurosci* **10**(8): 3398-3403.
- Hoefgen S, Coburger I, Roeser D, Schaub Y, Dahms SO & Than ME (2014). »Heparin induced dimerization of APP is primarily mediated by E1 and regulated by its acidic domain.« *J Struct Biol* **187**(1): 30-37.
- Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, ... Nicoll JA (2008). »Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial.« *Lancet* **372**(9634): 216-223.
- Holmes C & Lovestone S (2002). »The clinical phenotype of familial and sporadic late onset Alzheimer's disease.« *Int J Geriatr Psychiatry* **17**(2): 146-149.
- Holtzman DM, Morris JC & Goate AM (2011). »Alzheimer's disease: the challenge of the second century.« *Sci Transl Med* **3**(77): 77sr71-77sr71.
- Hori Y, Hashimoto T, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K, Condrón MM, ... Iwatsubo T (2007). »The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer disease mutations accelerate A β fibril formation without increasing protofibril formation.« *J Biol Chem* **282**(7): 4916-4923.
- Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Franberg J, Winblad B, ... Tjernberg LO (2008). »Active γ -secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain.« *FEBS J* **275**(6): 1174-1187.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, ... Montine TJ (2012). »National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease.« *Alzheimers Dement* **8**(1): 1-13.
- Ikeuchi T, Dolios G, Kim SH, Wang R & Sisodia SS (2003). »Familial Alzheimer disease-linked presenilin 1 variants enhance production of both A β 1-40 and A β 1-42 peptides that are only partially sensitive to a potent aspartyl protease transition state inhibitor of " γ -secretase".« *J Biol Chem* **278**(9): 7010-7018.
- Imbimbo BP (2009). »Why did tarenflurbil fail in Alzheimer's disease?« *J Alzheimers Dis* **17**(4): 757-760.
- Imbimbo BP, Giardino L, Sivilia S, Giuliani A, Gusciglio M, Pietrini V, ... Calza L (2010). »CHF5074, a novel γ -secretase modulator, restores hippocampal neurogenesis potential and reverses contextual memory deficit in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.« *J Alzheimers Dis* **20**(1): 159-173.
- Isoo N, Sato C, Miyashita H, Shinohara M, Takasugi N, Morohashi Y, ... Iwatsubo T (2007). »A β 42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of γ -secretase: common effects of Pen-2 N-terminal elongation and fenofibrate.« *J Biol Chem* **282**(17): 12388-12396.

- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N & Ihara Y (1994). »Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43).« *Neuron* **13**(1): 45-53.
- Jakel L, Boche D, Nicoll JAR & Verbeek MM (2019). »A β 43 in human Alzheimer's disease: effects of active A β 42 immunization.« *Acta Neuropathol Commun* **7**(1): 141.
- Jarrett JT, Berger EP & Lansbury PT, Jr. (1993). »The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.« *Biochemistry* **32**(18): 4693-4697.
- Jarrett JT & Lansbury PT, Jr. (1993). »Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?« *Cell* **73**(6): 1055-1058.
- Jay TR, Hirsch AM, Broihier ML, Miller CM, Neilson LE, Ransohoff RM, ... Landreth GE (2017). »Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease.« *J Neurosci* **37**(3): 637-647.
- Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D & Selkoe DJ (2011). »Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(14): 5819-5824.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, ... Stefansson K (2012). »A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline.« *Nature* **488**(7409): 96-99.
- Jumpertz T, Rennhack A, Ness J, Baches S, Pietrzik CU, Bulic B & Weggen S (2012). »Presenilin is the molecular target of acidic γ -secretase modulators in living cells.« *PLoS One* **7**(1): e30484.
- Jung JJ, Ran Y, Cruz PE, Rosario AM, Ladd TB, Kukar TL, ... Golde TE (2014). »Complex relationships between substrate sequence and sensitivity to alterations in γ -secretase processivity induced by γ -secretase modulators.« *Biochemistry* **53**(12): 1947-1957.
- Jurisch-Yaksi N, Sannerud R & Annaert W (2013). »A fast growing spectrum of biological functions of γ -secretase in development and disease.« *Biochim Biophys Acta* **1828**(12): 2815-2827.
- Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H & Haass C (2004). »The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity.« *EMBO J* **23**(24): 4738-4748.
- Kaether C, Lammich S, Edbauer D, Ertl M, Rietdorf J, Capell A, ... Haass C (2002). »Presenilin-1 affects trafficking and processing of β APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane.« *J Cell Biol* **158**: 551-561.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, ... Malinow R (2003). »APP processing and synaptic function.« *Neuron* **37**(6): 925-937.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, ... Muller-Hill B (1987). »The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.« *Nature* **325**(6106): 733-736.
- Karch CM & Goate AM (2015). »Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis.« *Biol Psychiatry* **77**(1): 43-51.
- Karran E & De Strooper B (2016). »The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure?« *J Neurochem* **139 Suppl 2**: 237-252.
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, ... Amit I (2017). »A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease.« *Cell* **169**(7): 1276-1290.e1217.
- Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, ... Holtzman DM (2009). »Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A β clearance.« *Neuron* **64**(5): 632-644.
- Kim J, Onstead L, Randle S, Price R, Smithson L, Zwizinski C, ... McGowan E (2007). »A β 40 inhibits amyloid deposition *in vivo*.« *J Neurosci* **27**(3): 627-633.
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS & Selkoe DJ (2003). » γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2.« *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(11): 6382-6387.
- Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, Wolfe MS & Selkoe DJ (2000). »The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation.« *J Biol Chem* **275**(5): 3173-3178.
- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY & Selkoe DJ (2001). »The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner.« *J Biol Chem* **276**(43): 40288-40292.

- Kimura A, Hata S & Suzuki T (2016). »Alternative Selection of β -Site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) cleavage sites in amyloid β -protein precursor (APP) harboring protective and pathogenic mutations within the A β sequence.« *J Biol Chem* **291**(46): 24041-24053.
- Koch P, Tamboli IY, Mertens J, Wunderlich P, Ladewig J, Stüber K, ... Walter J (2012). »Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of γ -secretase activity in endogenous amyloid- β generation.« *Am J Pathol* **180**(6): 2404-2416.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, ... Spires-Jones TL (2009). »Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(10): 4012-4017.
- Kondo T, Imamura K, Funayama M, Tsukita K, Miyake M, Ohta A, ... Inoue H (2017). »iPSC-Based compound screening and *in vitro* trials identify a synergistic anti-amyloid β combination for Alzheimer's disease.« *Cell Rep* **21**(8): 2304-2312.
- Koo EH & Squazzo SL (1994). »Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway.« *J Biol Chem* **269**(26): 17386-17389.
- Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K & Grundke-Iqbal I (1993). »Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease.« *J Biol Chem* **268**(32): 24374-24384.
- Koppensteiner P, Trinchese F, Fa M, Puzzo D, Gulisano W, Yan S, ... Arancio O (2016). »Time-dependent reversal of synaptic plasticity induced by physiological concentrations of oligomeric A β 42: an early index of Alzheimer's disease.« *Sci Rep* **6**: 32553.
- Kosik KS, Joachim CL & Selkoe DJ (1986). »Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 4044-4048.
- Kounnas MZ, Danks AM, Cheng S, Tyree C, Ackerman E, Zhang X, ... Wagner SL (2010). »Modulation of γ -secretase reduces β -amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.« *Neuron* **67**(5): 769-780.
- Kounnas MZ, Durakoglulugil MS, Herz J & Comer WT (2019). »NGP 555, a γ -secretase modulator, shows a beneficial shift in the ratio of amyloid biomarkers in human cerebrospinal fluid at safe doses.« *Alzheimers Dement (N Y)* **5**: 458-467.
- Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, ... Butovsky O (2017). »The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases.« *Immunity* **47**(3): 566-581.e569.
- Kretner B, Fukumori A, Gutsmedl A, Page RM, Luebbbers T, Galley G, ... Steiner H (2011). »Attenuated A β 42 responses to low potency γ -secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds.« *J Biol Chem* **286**(17): 15240-15251.
- Kretner B, Fukumori A, Kuhn PH, Perez-Revuelta BI, Lichtenthaler SF, Haass C & Steiner H (2013). »Important functional role of residue x of the presenilin GxGD protease active site motif for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretase.« *J Neurochem* **125**(1): 144-156.
- Kretner B, Trambauer J, Fukumori A, Mielke J, Kuhn PH, Kremmer E, ... Steiner H (2016). »Generation and deposition of A β 43 by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer's disease.« *EMBO Mol Med* **8**(5): 458-465.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, ... Lichtenthaler SF (2010). »ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons.« *EMBO J* **29**(17): 3020-3032.
- Kukar T, Prescott S, Eriksen JL, Holloway V, Murphy MP, Koo EH, ... Nicolle MM (2007). »Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice.« *BMC Neurosci* **8**: 54.
- Kukar TL, Ladd TB, Bann MA, Fraering PC, Narlawar R, Maharvi GM, ... Golde TE (2008). »Substrate-targeting γ -secretase modulators.« *Nature* **453**(7197): 925-929.
- Kukar TL, Ladd TB, Robertson P, Pintchovski SA, Moore B, Bann MA, ... Golde TE (2011). »Lysine 624 of the amyloid precursor protein (APP) is a critical determinant of amyloid β peptide length: support for a sequential model of γ -secretase intramembrane proteolysis and regulation by the amyloid β precursor protein (APP) juxtamembrane region.« *J Biol Chem* **286**(46): 39804-39812.
- Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, ... De Strooper B (2010). »Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio.« *EMBO J* **29**(19): 3408-3420.
- Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy EA, Paquet D, Duffield M, ... Tessier-Lavigne M (2019). »A large panel of isogenic APP and PSEN1 mutant human iPSC neurons reveals shared endosomal abnormalities mediated by APP β -CTFs, not A β .« *Neuron* **104**(2): 256-270.e255.

- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, ... Klein WL (2007). »A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.« J Neurosci 27(4): 796-807.
- Lai A, Sisodia SS & Trowbridge IS (1995). »Characterization of sorting signals in the β -amyloid precursor protein cytoplasmic domain.« J Biol Chem 270(8): 3565-3573.
- Lai F & Williams RS (1989). »A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome.« Arch Neurol 46(8): 849-853.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, ... Fahrenholz F (1999). »Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.« Proc Natl Acad Sci U S A 96(7): 3922-3927.
- Lanz TA, Himes CS, Pallante G, Adams L, Yamazaki S, Amore B & Merchant KM (2003). »The γ -secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A β levels *in vivo* in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice.« J Pharmacol Exp Ther 305(3): 864-871.
- Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn PH, Cheng Q, Chu Y, Schmidt-Supprian M, ... Meinel E (2015). » γ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells.« Nat Commun 6: 7333.
- LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS & Selkoe DJ (2003). »Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate sub-complex of APh-1 and nicastrin.« J Biol Chem 278: 37213-37222.
- Lazarov VK, Fraering PC, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ & Li H (2006). »Electron microscopic structure of purified, active γ -secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores.« Proc Natl Acad Sci USA 103(18): 6889-6894.
- Lee JR, Urban S, Garvey CF & Freeman M (2001a). »Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*.« Cell 107(2): 161-171.
- Lee SF, Shah S, Li H, Yu C, Han W & Yu G (2002). »Mammalian APh-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid- β precursor protein and notch.« J Biol Chem 277(47): 45013-45019.
- Lee VM, Goedert M & Trojanowski JQ (2001b). »Neurodegenerative tauopathies.« Annu Rev Neurosci 24: 1121-1159.
- Leem JY, Vijayan S, Han P, Cai D, Machura M, Lopes KO, ... Thinakaran G (2002). »Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin.« J Biol Chem 277(21): 19236-19240.
- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC & Selkoe DJ (1996). »Sequence of deposition of heterogeneous amyloid β -peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation.« Neurobiol Dis 3(1): 16-32.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, ... et al. (1995). »Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.« Science 269(5226): 973-977.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, ... McGowan E (2001). »Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP.« Science 293(5534): 1487-1491.
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM & Selkoe D (2009). »Soluble oligomers of amyloid β -protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake.« Neuron 62(6): 788-801.
- Li Y, Lu SH-J, Tsai C-J, Bohm C, Qamar S, Dodd RB, ... St George-Hyslop PH (2014). »Structural interactions between inhibitor and substrate docking sites give insight into mechanisms of human PS1 complexes.« Structure 22(1): 125-135.
- Lichtenthaler SF, Haass C & Steiner H (2011). »Regulated intramembrane proteolysis-lessons from amyloid precursor protein processing.« J Neurochem 117(5): 779-796.
- Lippa CF, Saunders AM, Smith TW, Swearer JM, Drachman DA, Ghetti B, ... Pollen DA (1996). »Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway.« Neurology 46(2): 406-412.
- Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H & Bu G (2013). »Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy.« Nat Rev Neurol 9(2): 106-118.
- Liu L, Ding L, Rovere M, Wolfe MS & Selkoe DJ (2019). »A cellular complex of BACE1 and γ -secretase sequentially generates A β from its full-length precursor.« J Cell Biol 218(2): 644-663.
- Liu Q, Waltz S, Woodruff G, Ouyang J, Israel MA, Herrera C, ... Yuan SH (2014). »Effect of potent γ -secretase modulator in human neurons derived from multiple presenilin 1-induced pluripotent stem cell mutant carriers.« JAMA Neurol 71(12): 1481-1489.

- Lleo A, Berezovska O, Herl L, Raju S, Deng A, Bacskaï BJ, ... Hyman BT (2004). »Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower A β 42 and change presenilin 1 conformation.« *Nat Med* 10(10): 1065-1066.
- Long JM & Holtzman DM (2019). »Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies.« *Cell* 179(2): 312-339.
- Lopez-Otin C & Bond JS (2008). »Proteases: multifunctional enzymes in life and disease.« *J Biol Chem* 283(45): 30433-30437.
- López AR, Dimitrov M, Gerber H, Braman V, Hacker DL, Wurm FM & Fraering PC (2015). »Production of active glycosylation-deficient γ -secretase complex for crystallization studies.« *Biotechnol Bioeng* 112(12): 2516-2526.
- Lopez Lopez C, Caputo A, Liu F, Riviere ME, Rouzade-Dominguez ML, Thomas RG, ... Tariot PN (2017). »The Alzheimer's Prevention Initiative Generation Program: evaluating CNP520 efficacy in the prevention of Alzheimer's disease.« *J Prev Alzheimers Dis* 4(4): 242-246.
- Loureiro RM, Dumin JA, McKee TD, Austin WF, Fuller NO, Hubbs JL, ... Tate B (2013). »Efficacy of SPI-1865, a novel γ -secretase modulator, in multiple rodent models.« *Alzheimers Res Ther* 5(2): 19.
- Lovering F, Bikker J & Humblet C (2009). »Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success.« *J Med Chem* 52(21): 6752-6756.
- Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, ... Bredesen DE (2000). »A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β -protein precursor.« *Nat Med* 6(4): 397-404.
- Luo W-j, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee H-J, ... Xu H (2003). »PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1.« *J Biol Chem* 278(10): 7850-7854.
- Manolaridis I, Kulkarni K, Dodd RB, Ogasawara S, Zhang Z, Bineva G, ... Barford D (2013). »Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1.« *Nature* 504(7479): 301-305.
- Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R & Robakis NK (2003). »A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/ ϵ -cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations.« *Cell* 114(5): 635-645.
- Marquez-Sterling NR, Lo AC, Sisodia SS & Koo EH (1997). »Trafficking of cell-surface β -amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling.« *J Neurosci* 17(1): 140-151.
- Marsh SE, Abud EM, Lakatos A, Karimzadeh A, Yeung ST, Davtyan H, ... Blurton-Jones M (2016). »The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function.« *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(9): E1316-1325.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL & Beyreuther K (1985). »Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.« *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12): 4245-4249.
- Matsuda S, Giliberto L, Matsuda Y, McGowan EM & D'Adamio L (2008). »BRI2 inhibits amyloid β -peptide precursor protein processing by interfering with the docking of secretases to the substrate.« *J Neurosci* 28(35): 8668-8676.
- Matsumura N, Takami M, Okochi M, Wada-Kakuda S, Fujiwara H, Tagami S, ... Morishima-Kawashima M (2014). » γ -Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of β -carboxyl-terminal fragment.« *J Biol Chem* 289(8): 5109-5121.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, ... Bateman RJ (2010). »Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease.« *Science* 330(6012): 1774.
- Meckler X & Checler F (2016). »Presenilin 1 and presenilin 2 target γ -secretase complexes to distinct cellular compartments.« *J Biol Chem* 291(24): 12821-12837.
- Mecozzi VJ, Berman DE, Simoes S, Vetanovetz C, Awal MR, Patel VM, ... Small SA (2014). »Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing.« *Nat Chem Biol* 10(6): 443-449.
- Meng P, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Xing F, Hayakari R, ... Imaizumi T (2015). »Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid- β 1-42 or 1-43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.« *Neurosci Res* 94: 1-9.
- Messa M, Colombo L, del Favero E, Cantu L, Stoilova T, Cagnotto A, ... Salmona M (2014). »The peculiar role of the A2V mutation in amyloid- β (A β) 1-42 molecular assembly.« *J Biol Chem* 289(35): 24143-24152.
- Micchelli CA, Esler WP, Kimberly WT, Jack C, Berezovska O, Kornilova A, ... Wolfe MS (2003). » γ -Secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy *Notch* mutations in *Drosophila*.« *FASEB J* 17(1): 79-81.
- Miklossy J, Taddei K, Suva D, Verdile G, Fonte J, Fisher C, ... Martins RN (2003). »Two novel presenilin-1 mutations (Y256S and Q222H) are associated with early-onset Alzheimer's disease.« *Neurobiol Aging* 24(5): 655-662.

- Mitani Y, Yarimizu J, Saita K, Uchino H, Akashiba H, Shitaka Y, ... Matsuoka N (2012). »Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice.« J Neurosci **32**(6): 2037-2050.
- Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, ... Steiner H (2002). »Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the notch and APP intracellular domains independent of their effect on A β 42 production.« Proc Natl Acad Sci USA **99**(12): 8025-8030.
- Moniruzzaman M, Ishihara S, Nobuhara M, Higashide H & Funamoto S (2018). »Glycosylation status of nicastrin influences catalytic activity and substrate preference of γ -secretase.« Biochem Biophys Res Commun **502**(1): 98-103.
- Moore BD, Martin J, de Mena L, Sanchez J, Cruz PE, Ceballos-Diaz C, ... Golde TE (2018). »Short A β peptides attenuate A β 42 toxicity *in vivo*.« J Exp Med **215**(1): 283-301.
- Moore S, Evans LD, Andersson T, Portelius E, Smith J, Dias TB, ... Livesey FJ (2015). »APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons.« Cell Rep **11**(5): 689-696.
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA & Xu L (2010). »A physiological role for amyloid- β protein: enhancement of learning and memory.« J Alzheimers Dis **19**(2): 441-449.
- Moulder KL, Snider BJ, Mills SL, Buckles VD, Santacruz AM, Bateman RJ & Morris JC (2013). »Dominantly Inherited Alzheimer Network: facilitating research and clinical trials.« Alzheimers Res Ther **5**(5): 48.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, ... McConlogue L (2000). »High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation.« J Neurosci **20**(11): 4050-4058.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B & Lannfelt L (1992). »A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid.« Nat Genet **1**(5): 345-347.
- Müller UC, Deller T & Korte M (2017). »Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family.« Nat Rev Neurosci **18**(5): 281-298.
- Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, Behr D, Ruppert T, Masters CL & Beyreuther K (1996). »The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I).« Science **271**(5254): 1406-1409.
- Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, ... Multhaup G (2007). »GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β 42.« EMBO J **26**(6): 1702-1712.
- Murphy MP, Hickman LJ, Eckman CB, Uljon SN, Wang R & Golde TE (1999). » γ -Secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid β peptides of varying length.« J Biol Chem **274**(17): 11914-11923.
- Murray B, Sorci M, Rosenthal J, Lippens J, Isaacson D, Das P, ... Belfort G (2016). »A2T and A2V A β peptides exhibit different aggregation kinetics, primary nucleation, morphology, structure, and LTP inhibition.« Proteins **84**(4): 488-500.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B & Benson MD (1991). »A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease.« Science **254**(5028): 97-99.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, ... Beach TG (2012). »Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature.« J Neuropathol Exp Neurol **71**(5): 362-381.
- Nicoll JAR, Buckland GR, Harrison CH, Page A, Harris S, Love S, ... Boche D (2019). »Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid- β immunization in Alzheimer's disease.« Brain **142**(7): 2113-2126.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD & Tessier-Lavigne M (2009). »APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases.« Nature **457**(7232): 981-989.
- Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, ... Lannfelt L (2001). »The 'arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation.« Nat Neurosci **4**(9): 887-893.
- Nochlin D, van Belle G, Bird TD & Sumi SM (1993). »Comparison of the severity of neuropathologic changes in familial and sporadic Alzheimer's disease.« Alzheimer Dis Assoc Disord **7**(4): 212-222.
- Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE & Greengard P (1993). »Identification of the Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells.« J Biol Chem **268**(1): 608-612.
- Oehlrich D, Berthelot DJ & Gijzen HJ (2011). » γ -Secretase modulators as potential disease modifying anti-Alzheimer's drugs.« J Med Chem **54**(3): 669-698.

- Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Berezovska O, ... Iwatsubo T (2011). »Phenylpiperidine-type γ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1.« *EMBO J* 30(23): 4815-4824.
- Okochi M, Eimer S, Bottcher A, Baumeister R, Romig H, Walter J, ... Haass C (2000). »A loss of function mutant of the presenilin homologue SEL-12 undergoes aberrant endoproteolysis in *Caenorhabditis elegans* and increases A β 42 generation in human cells.« *J Biol Chem* 275(52): 40925-40932.
- Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, ... Takeda M (2006). »Secretion of the notch-1 A β -like peptide during notch signaling.« *J Biol Chem* 281(12): 7890-7898.
- Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takami M, Kodama TS, Mori K, ... Takeda M (2013). » γ -Secretase modulators and presenilin 1 mutants act differently on presenilin/ γ -secretase function to cleave A β 42 and A β 43.« *Cell Rep* 3(1): 42-51.
- Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, ... Lundkvist J (2014). »Characterization of intermediate steps in amyloid β (A β) production under near-native conditions.« *J Biol Chem* 289(3): 1540-1550.
- Oltsersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood KL, Beattie EC, ... Sinha S (1989). »The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II.« *Nature* 341(6238): 144-147.
- Osenkowski P, Li H, Ye W, Li D, Aeschbach L, Fraering PC, ... Li H (2009). »Cryo-electron microscopy structure of purified γ -secretase at 12 Å resolution.« *J Mol Biol* 385(2): 642-652.
- Osenkowski P, Ye W, Wang R, Wolfe MS & Selkoe DJ (2008). »Direct and potent regulation of γ -secretase by its lipid microenvironment.« *J Biol Chem* 283(33): 22529-22540.
- Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, ... Fontoura P (2017). »A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease.« *Alzheimers Res Ther* 9(1): 95.
- Ousson S, Saric A, Baguet A, Losberger C, Genoud S, Vilbois F, ... Behr D (2013). »Substrate determinants in the C99 juxtamembrane domains differentially affect γ -secretase cleavage specificity and modulator pharmacology.« *J Neurochem* 125(4): 610-619.
- Page RM, Baumann K, Tomioka M, Perez-Revuelta BI, Fukumori A, Jacobsen H, ... Haass C (2008). »Generation of A β 38 and A β 42 is independently and differentially affected by FAD-associated presenilin 1 mutations and γ -secretase modulation.« *J Biol Chem* 283: 677-683.
- Page RM, Gutsmedl A, Fukumori A, Winkler E, Haass C & Steiner H (2010). » β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators.« *J Biol Chem* 285(23): 17798-17810.
- Panza F, Lozupone M, Loggoscino G & Imbimbo BP (2019). »A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease.« *Nat Rev Neurol* 15(2): 73-88.
- Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, Zhang S, Ackerley CA, Pak BJ, ... Mahuran DJ (2003). »Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and γ -secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane.« *J Biol Chem* 278(29): 26687-26694.
- Pastor P, Roe CM, Villegas A, Bedoya G, Chakraverty S, Garcia G, ... Goate AM (2003). »Apolipoprotein E ϵ 4 modifies Alzheimer's disease onset in an E280A PS1 kindred.« *Ann Neurol* 54(2): 163-169.
- Penney J, Ralvenius WT & Tsai LH (2019). »Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells.« *Mol Psychiatry*.
- Pérez-Revuelta BI, Fukumori A, Lammich S, Yamasaki A, Haass C & Steiner H (2010). »Requirement for small side chain residues within the GxGD-motif of presenilin for γ -secretase substrate cleavage.« *J Neurochem* 112(4): 940-950.
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, ... Koo EH (1999). »Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42.« *J Biol Chem* 274(27): 18851-18856.
- Petit D, Hitzberger M, Lismont S, Zoltowska KM, Ryan NS, Mercken M, ... Chavez-Gutierrez L (2019). »Extracellular interface between APP and nicastrin regulates A β length and response to γ -secretase modulators.« *EMBO J* 38(12).
- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C & Pearson HA (2003). »The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons.« *J Neurosci* 23(13): 5531-5535.
- Podlisny MB, Citron M, Amarante P, Sherrington R, Xia W, Zhang J, ... Selkoe DJ (1997). »Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue.« *Neurobiol Dis* 3(4): 325-337.
- Pooler AM, Polydoro M, Maury EA, Nicholls SB, Reddy SM, Wegmann S, ... Hyman BT (2015). »Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease.« *Acta Neuropathol Commun* 3: 14.

- Portelius E, Van Broeck B, Andreasson U, Gustavsson MK, Mercken M, Zetterberg H, ... Blennow K (2010). »Acute effect on the A β isoform pattern in CSF in response to γ -secretase modulator and inhibitor treatment in dogs.« *J Alzheimers Dis* **21**(3): 1005-1012.
- Pozdnyakov N, Murrey HE, Crump CJ, Pettersson M, Ballard TE, Am Ende CW, ... Johnson DS (2013). » γ -Secretase modulator (GSM) photoaffinity probes reveal distinct allosteric binding sites on presenilin.« *J Biol Chem* **288**(14): 9710-9720.
- Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G, Wu Y & Prina A (2015). »World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, costs and trends, Alzheimer's Disease International, London.«.
- Prokop S, Haass C & Steiner H (2005). »Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments.« *J Neurochem* **94**(1): 57-62.
- Prokop S, Shirotani K, Edbauer D, Haass C & Steiner H (2004). »Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the γ -secretase complex.« *J Biol Chem* **279**(22): 23255-23261.
- Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, ... Arancio O (2011). »Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory.« *Ann Neurol* **69**(5): 819-830.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A & Arancio O (2008). »Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus.« *J Neurosci* **28**(53): 14537-14545.
- Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotsu N, Horikoshi Y, ... Ihara Y (2005). »Longer forms of amyloid β protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by γ -secretase.« *J Neurosci* **25**(2): 436-445.
- Quintero-Monzon O, Martin MM, Fernandez MA, Cappello CA, Krzysiak AJ, Osenkowski P & Wolfe MS (2011). »Dissociation between the processivity and total activity of γ -secretase: implications for the mechanism of Alzheimer's disease-causing presenilin mutations.« *Biochemistry* **50**(42): 9023-9035.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP & Ferreira A (2002). »Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6364-6369.
- Rawson RB (2013). »The site-2 protease.« *Biochim Biophys Acta* **1828**(12): 2801-2807.
- Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, ... Goldstein JL (1997). »Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs.« *Mol Cell* **1**(1): 47-57.
- Reiman EM, Arboleda-Velasquez JF, Quiroz YT, Huentelman MJ, Beach TG, Caselli RJ, ... The Alzheimer's Disease Genetics C (2020). »Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study.« *Nat Commun* **11**(1): 667.
- Reiman EM, Langbaum JBS, Fleisher AS, Caselli RJ, Chen K, Ayutyanont N, ... Tariot PN (2011). »Alzheimer's Prevention Initiative: A plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments.« *J Alzheimers Dis* **26**: 321-329.
- Reinert J, Martens H, Huettenrauch M, Kolbow T, Lannfelt L, Ingelsson M, ... Wirths O (2014). »A β 38 in the brains of patients with sporadic and familial Alzheimer's disease and transgenic mouse models.« *J Alzheimers Dis* **39**(4): 871-881.
- Ren Z, Schenk D, Basi GS & Shapiro IP (2007). »Amyloid β -protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of γ -secretase-dependent cleavages.« *J Biol Chem* **282**(48): 35350-35360.
- Rice HC, de Malmazet D, Schreurs A, Frere S, Van Molle I, Volkov AN, ... de Wit J (2019). »Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA B 1a ligand to modulate synaptic transmission.« *Science* **363**(6423): eaao4827.
- Richter MC, Ludewig S, Winschel A, Abel T, Bold C, Salzburger LR, ... Muller UC (2018). »Distinct *in vivo* roles of secreted APP ectodomain variants APPs α and APPs β in regulation of spine density, synaptic plasticity, and cognition.« *EMBO J* **37**(11).
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, ... Muller UC (2007). »The secreted β -amyloid precursor protein ectodomain APPs α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice.« *J Neurosci* **27**(29): 7817-7826.
- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G & Wisniewski HM (1987). »Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(12): 4190-4194.
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, ... Mucke L (2011). »Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease.« *J Neurosci* **31**(2): 700-711.

- Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, ... Mucke L (2007). »Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model.« Science **316**(5825): 750-754.
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I & Saitoh T (1994). »Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid β /A4 protein precursor.« Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7450-7454.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, ... et al. (1995). »Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene.« Nature **376**(6543): 775-778.
- Rogers K, Felsenstein KM, Hrdlicka L, Tu Z, Albayya F, Lee W, ... Koenig G (2012). »Modulation of γ -secretase by EVP-0015962 reduces amyloid deposition and behavioral deficits in Tg2576 mice.« Mol Neurodegener **7**: 61.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, ... Campion D (2006). »APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy.« Nat Genet **38**(1): 24-26.
- Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Slegers K, Funamoto S, Mihira N, ... Saido TC (2011). »Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43.« Nat Neurosci **14**(8): 1023-1032.
- Sannerud R & Annaert W (2009). »Trafficking, a key player in regulated intramembrane proteolysis.« Semin Cell Dev Biol **20**(2): 183-190.
- Sannerud R, Esselens C, Ejsmont P, Mattera R, Rochin L, Tharkeshwar AK, ... Annaert W (2016). »Restricted location of PSEN2/ γ -secretase determines substrate specificity and generates an intracellular A β pool.« Cell **166**(1): 193-208.
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, ... Haass C (2001). »Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of notch.« EMBO Rep **2**: 835-841.
- Sato C, Morohashi Y, Tomita T & Iwatsubo T (2006). »Structure of the catalytic pore of γ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines.« J Neurosci **26**(46): 12081-12088.
- Sato C, Takagi S, Tomita T & Iwatsubo T (2008). »The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the γ -secretase.« J Neurosci **28**(24): 6264-6271.
- Sato C, Zhao G & Ilagan MX (2012). »An overview of notch signaling in adult tissue renewal and maintenance.« Curr Alzheimer Res **9**(2): 227-240.
- Sato T, Dohmae N, Qi Y, Kakuda N, Misonou H, Mitsumori R, ... Ihara Y (2003). »Potential link between amyloid β -protein 42 and C-terminal fragment γ 49-99 of β -amyloid precursor protein.« J Biol Chem **278**(27): 24294-24301.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, ... Seubert P (1999). »Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse.« Nature **400**(6740): 173-177.
- Schettini G, Govoni S, Racchi M & Rodriguez G (2010). »Phosphorylation of APP-CTF-AICD domains and interaction with adaptor proteins: signal transduction and/or transcriptional role - relevance for Alzheimer pathology.« J Neurochem **115**(6): 1299-1308.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, ... Younkin S (1996). »Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease.« Nat Med **2**(8): 864-870.
- Schönherr C, Bien J, Isbert S, Wichert R, Prox J, Altmeppen H, ... Pietrzik CU (2016). »Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site.« Mol Neurodegener **11**: 19.
- Schroeter EH, Kisslinger JA & Kopan R (1998). »Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain.« Nature **393**(6683): 382-386.
- Schwann T (1836). »Ueber das Wesen des Verdauungsprocesses.« Annalen der Pharmacie **20**(1): 28-34.
- Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, ... Hill RG (1999). »Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein.« Neuropharmacology **38**(3): 349-359.
- Selkoe DJ & Hardy J (2016). »The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years.« EMBO Mol Med **8**(6): 595-608.
- Serneels L, Van Biervliet J, Craessaerts K, Dejaegere T, Horre K, Van Houtvin T, ... De Strooper B (2009). » γ -Secretase heterogeneity in the APH1 subunit: relevance for Alzheimer's disease.« Science **324**(5927): 639-642.

- Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, ... Sandrock A (2016). »The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease.« Nature **537**(7618): 50-56.
- Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, Laplant Q, ... Yu G (2005). »Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor.« Cell **122**(3): 435-447.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, ... Selkoe DJ (2008). »Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory.« Nat Med **14**(8): 837-842.
- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ & Tonegawa S (1997). »Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice.« Cell **89**(4): 629-639.
- Shen J & Kelleher RJ, 3rd (2007). »The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism.« Proc Natl Acad Sci USA **104**(2): 403-409.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, ... St George-Hyslop PH (1995). »Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.« Nature **375**(6534): 754-760.
- Shiraishi H, Sai X, Wang HQ, Maeda Y, Kurono Y, Nishimura M, ... Komano H (2004). »PEN-2 enhances γ -cleavage after presenilin heterodimer formation.« J Neurochem **90**(6): 1402-1413.
- Shirotni K, Edbauer D, Prokop S, Haass C & Steiner H (2004). »Identification of distinct γ -secretase complexes with different APH-1 variants.« J Biol Chem **279**(40): 41340-41345.
- Shirotni K, Tomioka M, Kremmer E, Haass C & Steiner H (2007). »Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different γ -secretase complexes.« Neurobiol Dis **27**(1): 102-107.
- Siegel G, Gerber H, Koch P, Bruestle O, Fraering PC & Rajendran L (2017). »The Alzheimer's disease γ -secretase generates higher 42:40 ratios for β -amyloid than for p3 peptides.« Cell Rep **19**(10): 1967-1976.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, ... et al. (1999). »Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain.« Nature **402**(6761): 537-540.
- Sisodia SS (1992). » β -Amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease.« Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6075-6079.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A & Price DL (1990). »Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing.« Science **248**(4954): 492-495.
- Sivilia S, Lorenzini L, Giuliani A, Gusciglio M, Fernandez M, Baldassarro VA, ... Giardino L (2013). »Multi-target action of the novel anti-Alzheimer compound CHF5074: *in vivo* study of long term treatment in Tg2576 mice.« BMC Neurosci **14**: 44.
- Small SA & Gandy S (2006). »Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis.« Neuron **52**(1): 15-31.
- Snider BJ, Norton J, Coats MA, Chakraverty S, Hou CE, Jervis R, ... Morris JC (2005). »Novel presenilin 1 mutation (S170F) causing Alzheimer disease with Lewy bodies in the third decade of life.« Arch Neurol **62**(12): 1821-1830.
- Spires-Jones TL, Attems J & Thal DR (2017). »Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases.« Acta Neuropathol **134**(2): 187-205.
- Spires-Jones TL & Hyman BT (2014). »The intersection of amyloid β and tau at synapses in Alzheimer's disease.« Neuron **82**(4): 756-771.
- Steiner H, Duff K, Capell A, Romig H, Grim MG, Lincoln S, ... Haass C (1999a). »A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid β -peptide production and notch signaling.« J Biol Chem **274**(40): 28669-28673.
- Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J, ... Haass C (2000). »Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases.« Nat Cell Biol **2**: 848-851.
- Steiner H, Romig H, Grim MG, Philipp U, Pesold B, Citron M, ... Haass C (1999b). »The biological and pathological function of the presenilin-1 Δ Exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing.« J Biol Chem **274**(12): 7615-7618.
- Steiner H, Romig H, Pesold B, Philipp U, Baader M, Citron M, ... Haass C (1999c). »Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis.« Biochemistry **38**(44): 14600-14605.
- Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, ... Haass C (2002). »PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin.« J Biol Chem **277**: 39062-39065.

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS & Roses AD (1993). »Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.« Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1977-1981.
- Struhl G & Adachi A (2000). »Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins.« Mol Cell **6**(3): 625-636.
- Struhl G & Greenwald I (1999). »Presenilin is required for activity and nuclear access of notch in *Drosophila*.« Nature **398**(6727): 522-525.
- Suarez-Calvet M, Araque Caballero MA, Kleinberger G, Bateman RJ, Fagan AM, Morris JC, ... Haass C (2016a). »Early changes in CSF sTREM2 in dominantly inherited Alzheimer's disease occur after amyloid deposition and neuronal injury.« Sci Transl Med **8**(369): 369ra178.
- Suarez-Calvet M, Kleinberger G, Araque Caballero MA, Brendel M, Rominger A, Alcolea D, ... Haass C (2016b). »sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers.« EMBO Mol Med **8**(5): 466-476.
- Sun L, Zhao L, Yang G, Yan C, Zhou R, Zhou X, ... Shi Y (2015). »Structural basis of human γ -secretase assembly.« Proc Natl Acad Sci U S A **112**(19): 6003-6008.
- Sun X, He G & Song W (2006). »BACE2, as a novel APP θ -secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome.« FASEB J **20**(9): 1369-1376.
- Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G & Gridley T (1994). »Notch1 is essential for postimplantation development in mice.« Genes Dev **8**(6): 707-719.
- Szaruga M, Munteanu B, Lismont S, Veugelen S, Horré K, Mercken M, ... Chávez-Gutiérrez L (2017). »Alzheimer's-causing mutations shift A β length by sestabilizing γ -secretase-A β n interactions.« Cell **170**(3): 443-456.e414.
- Szaruga M, Veugelen S, Benurwar M, Lismont S, Sepulveda-Falla D, Lleo A, ... Chavez-Gutierrez L (2015). »Qualitative changes in human γ -secretase underlie familial Alzheimer's disease.« J Exp Med **212**(12): 2003-2013.
- Tagami S, Yanagida K, Kodama TS, Takami M, Mizuta N, Oyama H, ... Okochi M (2017). »Semagacestat is a pseudo-inhibitor of γ -secretase.« Cell Rep **21**(1): 259-273.
- Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S & Ihara Y (2009). » γ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment.« J Neurosci **29**(41): 13042-13052.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, ... Iwatsubo T (2003). »The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex.« Nature **422**(6930): 438-441.
- Takeo K, Tanimura S, Shinoda T, Osawa S, Zahariev IK, Takegami N, ... Iwatsubo T (2014). »Allosteric regulation of γ -secretase activity by a phenylimidazole-type γ -secretase modulator.« Proc Natl Acad Sci U S A **111**(29): 10544-10549.
- Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, Usami M, Sahara N, Suzuki N, ... et al. (1994). »APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid β protein species (A β 1-42/43 and A β 1-40) in familial Alzheimer's disease brain.« J Biol Chem **269**(52): 32721-32724.
- Tang N & Kepp KP (2018). »A β 42/A β 40 Ratios of presenilin 1 mutations correlate with clinical onset of Alzheimer's disease.« J Alzheimers Dis **66**(3): 939-945.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, ... Neve RL (1987). »Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus.« Science **235**(4791): 880-884.
- TCW J & Goate AM (2017). »Genetics of β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease.« Cold Spring Harb Perspect Med **7**(6).
- Thal DR, Griffin WS, de Vos RA & Ghebremedhin E (2008). »Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease.« Acta Neuropathol **115**(6): 599-609.
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, ... Sisodia SS (1996). »Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vivo*.« Neuron **17**(1): 181-190.
- Tolia A, Chavez-Gutierrez L & De Strooper B (2006). »Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the γ -secretase complex.« J Biol Chem **281**: 27633-27642.
- Trambauer J, Fukumori A & Steiner H (2020a). »Pathogenic A β generation in familial Alzheimer's disease: novel mechanistic insights and therapeutic implications.« Curr Opin Neurobiol **61**: 73-81.
- Trambauer J, Rodriguez Sarmiento RM, Fukumori A, Feederle R, Baumann K & Steiner H (2020b). »A β 43-producing PS1 FAD mutants cause altered substrate interactions and respond to γ -secretase modulation.« EMBO Rep **21**(1): e47996.

- Uemura K, Farner KC, Hashimoto T, Nasser-Ghodsi N, Wolfe MS, Koo EH, ... Berezovska O (2010). »Substrate docking to γ -secretase allows access of γ -secretase modulators to an allosteric site.« Nat Commun **1**: 130.
- Uemura K, Lill CM, Li X, Peters JA, Ivanov A, Fan Z, ... Berezovska O (2009). »Allosteric modulation of PS1/ γ -secretase conformation correlates with amyloid $\beta_{42/40}$ ratio.« PLoS One **4**(11): e7893.
- Urban S, Lee JR & Freeman M (2001). »*Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases.« Cell **107**(2): 173-182.
- Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cines DB & Cunningham DD (1991). »Protease nexin-2/amyloid β -protein precursor in blood is a platelet-specific protein.« Biochem Biophys Res Commun **175**(1): 15-21.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, ... Citron M (1999). » β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE.« Science **286**(5440): 735-741.
- Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC & Lichtenthaler SF (2014). »Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects.« J Neurochem **130**(1): 4-28.
- Vellas B, Black R, Thal LJ, Fox NC, Daniels M, McLennan G, ... Grundman M (2009). »Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders.« Curr Alzheimer Res **6**(2): 144-151.
- Verghese PB, Castellano JM & Holtzman DM (2011). »Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders.« Lancet Neurol **10**(3): 241-252.
- Verhelst SHL (2017). »Intramembrane proteases as drug targets.« FEBS J **284**(10): 1489-1502.
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, ... Thinakaran G (2004). »Association of γ -secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes.« J Biol Chem **279**(43): 44945-44954.
- Vetrivel KS & Thinakaran G (2010). »Membrane rafts in Alzheimer's disease β -amyloid production.« Biochim Biophys Acta **1801**(8): 860-867.
- Veugelen S, Saito T, Saido TC, Chavez-Gutierrez L & De Strooper B (2016). »Familial Alzheimer's disease mutations in presenilin generate amyloidogenic A β peptide seeds.« Neuron **90**(2): 410-416.
- Villegas-Llerena C, Phillips A, Garcia-Reitboeck P, Hardy J & Pocock JM (2016). »Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease.« Curr Opin Neurobiol **36**: 74-81.
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, ... Masters CL (2013). »Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study.« Lancet Neurol **12**(4): 357-367.
- Voss M, Kunzel U, Higuel F, Kuhn PH, Colombo A, Fukumori A, ... Fluhrer R (2014). »Shedding of glycan-modifying enzymes by signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3) regulates cellular N-glycosylation.« EMBO J **33**(24): 2890-2905.
- Voss M, Schroder B & Fluhrer R (2013). »Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases.« Biochim Biophys Acta **1828**(12): 2828-2839.
- Wagner SL, Zhang C, Cheng S, Nguyen P, Zhang X, Rynearson KD, ... Tanzi RE (2014). »Soluble γ -secretase modulators selectively inhibit the production of the 42-amino acid amyloid β peptide variant and augment the production of multiple carboxy-truncated amyloid β species.« Biochemistry **53**(4): 702-713.
- Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, ... Golde TE (2002). »Cholesterol-dependent γ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains.« Neurobiol Dis **9**(1): 11-23.
- Wakabayashi T, Craessaerts K, Bammens L, Bentahir M, Borgions F, Herdewijn P, ... De Strooper B (2009). »Analysis of the γ -secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains.« Nat Cell Biol **11**(11): 1340-1346.
- Waldron E, Isbert S, Kern A, Jaeger S, Martin AM, Hebert SS, ... Pietrzik CU (2008). »Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene « Exp Cell Res **314**(13): 2419-2433.
- Walter J, Grunberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, ... Haass C (1997). »Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an *in vivo* substrate for protein kinase C.« Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5349-5354.
- Wang J, Behr D, Nyborg AC, Shearman MS, Golde TE & Goate A (2006). »C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation.« J Neurochem **96**(1): 218-227.

- Wang J, Brunkan AL, Hecimovic S, Walker E & Goate A (2004). »Conserved "PAL" sequence in presenilins is essential for γ -secretase activity, but not required for formation or stabilization of γ -secretase complexes.« *Neurobiol Dis* 15(3): 654-666.
- Wang Y & Mandelkow E (2016). »Tau in physiology and pathology.« *Nat Rev Neurosci* 17(1): 5-21.
- Watanabe H, Iqbal M, Zheng J, Wines-Samuelson M & Shen J (2014). »Partial loss of presenilin impairs age-dependent neuronal survival in the cerebral cortex.« *J Neurosci* 34(48): 15912-15922.
- Watanabe H & Shen J (2017). »Dominant negative mechanism of presenilin-1 mutations in FAD.« *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(48): 12635-12637.
- Weggen S & Behr D (2012). »Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease.« *Alzheimers Res Ther* 4(2): 9.
- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, ... Koo EH (2001). »A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity.« *Nature* 414(6860): 212-216.
- Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Ozols V, Fauq A, ... Koo EH (2003). »Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β 42 production by direct modulation of γ -secretase activity.« *J Biol Chem* 278(34): 31831-31837.
- Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, ... Evin G (2002). »A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with notch processing.« *Biochemistry* 41(8): 2825-2835.
- Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, Ashman K & Martoglio B (2002). »Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease.« *Science* 296(5576): 2215-2218.
- Weihofen A, Lemberg MK, Ploegh HL, Bogoy M & Martoglio B (2000). »Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor.« *J Biol Chem* 275(40): 30951-30956.
- WHO. (2016). »Top 10 causes of death.« abgerufen am 05.11.2019 unter: https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/.
- Wilcock GK, Black SE, Hendrix SB, Zavitz KH, Swabb EA & Laughlin MA (2008). »Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial.« *Lancet Neurol* 7(6): 483-493.
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, ... Haass C (2015). » η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus.« *Nature* 526(7573): 443-447.
- Wiltfang J, Smirnov A, Schnierstein B, Kelemen G, Matthies U, Klafki HW, ... Kornhuber J (1997). »Improved electrophoretic separation and immunoblotting of β -amyloid (A β) peptides 1-40, 1-42, and 1-43.« *Electrophoresis* 18(3-4): 527-532.
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, ... Zetterberg H (2016). »Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society.« *Lancet Neurol* 15(5): 455-532.
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W & Crowther RA (1988a). »Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease.« *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(13): 4884-4888.
- Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, ... Klug A (1988b). »Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease.« *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12): 4506-4510.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT & Selkoe DJ (1999). »Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity.« *Nature* 398(6727): 513-517.
- Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, ... Parker EM (2004). »Chronic treatment with the γ -secretase inhibitor LY-411,575 inhibits β -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation.« *J Biol Chem* 279(13): 12876-12882.
- Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji DJ, Trumbauer ME, ... Sisodia SS (1997). »Presenilin 1 is required for notch1 and DIII expression in the paraxial mesoderm.« *Nature* 387(6630): 288-292.
- Xia D, Watanabe H, Wu B, Lee SH, Li Y, Tsvetkov E, ... Kelleher RJ, 3rd (2015). »Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease.« *Neuron* 85(5): 967-981.
- Xia W, Ostaszewski BL, Kimberly WT, Rahmati T, Moore CL, Wolfe MS & Selkoe DJ (2000). »FAD mutations in presenilin-1 or amyloid precursor protein decrease the efficacy of a γ -secretase inhibitor: evidence for direct involvement of PS1 in the γ -secretase cleavage complex.« *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B): 673-681.

- Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Ishiura S & Ihara Y (2006). »DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid β -proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by γ -secretase.« *Biochemistry* **45**(12): 3952-3960.
- Yamasaki A, Eimer S, Okochi M, Smialowska A, Kaether C, Baumeister R, ... Steiner H (2006). »The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of γ -secretase.« *J Neurosci* **26**(14): 3821-3828.
- Yamazaki T, Koo EH & Selkoe DJ (1996). »Trafficking of cell-surface amyloid β -protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization.« *J Cell Sci* **109** (Pt 5): 999-1008.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, ... Gurney ME (1999). »Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity.« *Nature* **402**(6761): 533-537.
- Yan Y & Wang C (2007). »A β 40 protects non-toxic A β 42 monomer from aggregation.« *J Mol Biol* **369**(4): 909-916.
- Yang DS, Tandon A, Chen F, Yu G, Yu H, Arawaka S, ... Fraser PE (2002). »Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins.« *J Biol Chem* **277**(31): 28135-28142.
- Yang G, Zhou R, Zhou Q, Guo X, Yan C, Ke M, ... Shi Y (2019). »Structural basis of notch recognition by human γ -secretase.« *Nature* **565**(7738): 192-197.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, ... Shen Y (2003). »Elevated β -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease.« *Nat Med* **9**(1): 3-4.
- Yankner BA, Duffy LK & Kirschner DA (1990). »Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides.« *Science* **250**(4978): 279-282.
- Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC & Sheng M (2016). »TREM2 binds to apolipoproteins, including APOE and CLU/APOJ, and thereby facilitates uptake of amyloid- β by microglia.« *Neuron* **91**(2): 328-340.
- Yu C, Kim SH, Ikeuchi T, Xu H, Gasparini L, Wang R & Sisodia SS (2001). »Characterization of a presenilin-mediated APP carboxyl terminal fragment CTF γ : evidence for distinct mechanisms involved in γ -secretase processing of the APP and notch1 transmembrane domains.« *J Biol Chem* **276**: 43756-43760.
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, ... St George-Hyslop P (2000). »Nicastrin modulates presenilin-mediated *notch/glp-1* signal transduction and β APP processing.« *Nature* **407**(6800): 48-54.
- Yu Y, Logovinsky V, Schuck E, Kaplow J, Chang MK, Miyagawa T, ... Ferry J (2014). »Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel γ -secretase modulator, E2212, in healthy human subjects.« *J Clin Pharmacol* **54**(5): 528-536.
- Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E & Mandelkow EM (2013). »Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via tau-dependent microtubule severing by TTL6 and spastin.« *EMBO J* **32**(22): 2920-2937.
- Zhang X, Yu CJ & Sisodia SS (2015a). »The topology of pen-2, a γ -secretase subunit, revisited: evidence for a reentrant loop and a single pass transmembrane domain.« *Mol Neurodegener* **10**: 39.
- Zhang Z, Song M, Liu X, Su Kang S, Duong DM, Seyfried NT, ... Ye K (2015b). » δ -Secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease.« *Nat Commun* **6**: 8762.
- Zhao G, Cui MZ, Mao G, Dong Y, Tan J, Sun L & Xu X (2005). » γ -Cleavage is dependent on ζ -cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain.« *J Biol Chem* **280**(45): 37689-37697.
- Zhao G, Liu Z, Ilagan MX & Kopan R (2010). » γ -Secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin.« *J Neurosci* **30**(5): 1648-1656.
- Zhao G, Mao G, Tan J, Dong Y, Cui MZ, Kim SH & Xu X (2004). »Identification of a new presenilin-dependent ζ -cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein.« *J Biol Chem* **279**(49): 50647-50650.
- Zhou R, Yang G, Guo X, Zhou Q, Lei J & Shi Y (2019). »Recognition of the amyloid precursor protein by human γ -secretase.« *Science* **363**(6428).
- Zhou R, Yang G & Shi Y (2017). »Dominant negative effect of the loss-of-function γ -secretase mutants on the wild-type enzyme through heterooligomerization.« *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(48): 12731-12736.
- Zhu K, Peters F, Filser S & Herms J (2018). »Consequences of pharmacological BACE inhibition on synaptic structure and function.« *Biol Psychiatry* **84**(7): 478-487.
- Zou K, Liu J, Watanabe A, Hiraga S, Liu S, Tanabe C, ... Komano H (2013). »A β 43 is the earliest-depositing A β species in APP transgenic mouse brain and is converted to A β 41 by two active domains of ACE.« *Am J Pathol* **182**(6): 2322-2331.

Danksagung

Nach fast sieben Jahren Doktorarbeit ist es kaum zu glauben, aber es findet jetzt tatsächlich ein Ende. Es waren spannende Jahre und jeder in der Wissenschaft weiß, dass es ein ewiges Auf und Ab ist – das schafft sogar ausgeglichene Menschen als mich. Dass ich es doch geschafft habe, liegt an ganz vielen Menschen, die mich durch diese Zeit begleitet haben.

Der erste Dank geht an **Harald**, der mich all die Jahre begleitet hat, mit einer Mischung aus Ansporn, Verständnis und auch Geduld – zum Beispiel, wenn es fast ein Jahr dauert, um ein eigentlich etabliertes Protokoll zum Laufen zu bringen. Manchmal ist es halt doch die halbe Minute schnelles Auftauen. Oft sind es halt doch die Kleinigkeiten, die den Unterschied machen. Vielen Dank auch an **Christian Haass** für die konstante Unterstützung und die Visionen in der Wissenschaft, und dass man bei all den wunderbaren molekularen Einzelheiten doch nicht vergisst, dass am Ende doch was für den Menschen rausspringen muss.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Gruppe. Seit dem personellen Zuwachs vor jetzt schon mehr als 3 Jahren haben wir es geschafft eine kleine schlagkräftige Gruppe zu werden. Danke an **Edith** und **Gabi**, dass sie sich an all das erinnern können, was vorher schon gemacht wurde – das spart eine Menge Ärger und eröffnet doch so oft eine schöne Anekdote. Danke an **Edgar**, für die tollen „neu-deutschen“ Ausdrücke und, dass du so oft mit mir der Letzte auf dem Tollwood warst – Life goes on, just ignore the Brexit. Ohne **Nadine** hätte ich wohl viele vergessene Blots noch einmal machen müssen – und wäre nach 6 doch schon zu oft allein gewesen 😊. Bei **Lukas** weiß ich jetzt nicht wo ich anfangen oder aufhören soll – danke für all die Diskussion, ob über Wissenschaft, Unikoordination oder Gott und die Welt. Ich glaube wir waren beide am Anfang skeptisch ob das mit uns was wird, aber ich glaube wir haben das doch alles ganz gut hinbekommen!

Vielen Dank an die vielen Kollaborationspartner, **Thomas Arzberger** in der Neuropathologie, **Matthias Brendel** in der Nuklearmedizin sowie **Rosa Maria** und **Karlheinz** bei Roche – um nur einige zu nennen. Wir hatten großartige Projekte und es war eine Freude mit euch zu arbeiten.

In Bezug auf diese Arbeit geht ein großer Dank an meine fleißigen Korrektoren **Lukas**, **Nadine**, **Mareike**, **Susa**, **Julien**, **Carina** und **Alex**, ohne die mein intrinsischer Perfektionismus wohl noch etwas länger verbessert hätte.

Über die Jahre gab und gibt es viele Freunde, die dafür gesorgt haben, dass ich, auch wenn ich schon manchmal keine Lust auf die Arbeit hatte, doch immer gerne zur Arbeit gekommen bin und komme. Und ich hoffe, es ist mir keiner böse, falls ich jetzt wen vergesse.

Vielen Dank für ihre Geduld an **Carina**, die über die Jahre doch immer ein großer Halt war, ob im Kampf gegen den Irrsinn der Wissenschaft, die Unfähigkeit mancher mit-Doktoranden oder die Retreat-Policy des DZNEs. Nicht zu vergessen die, die dafür gesorgt haben, dass ich nie zu

wenig Kaffee bekommen habe, wie **Laura** und der morgendliche Kampf mit dem Joghurt in der Frühschicht sowie **Meike, Hanne** und **Mareike** (the last one standing) am Nachmittag. Ihr hattet immer einen freien Stuhl (inkl. Ohr) für mich, wenn auch zum Leidwesen Eddies. Vielen Dank an all die Leute, die nicht nur im Labor immer da waren, sondern die mit mir summers wie winters, drinnen und draußen, die Berge, Pisten und Kletterwände unsicher machen (oder machten und hoffentlich zukünftig wieder machen) – **Alex, Susa, Karsten, Lu, Carina** und **Hanne** – es macht immer wieder Spaß mit euch!

Und auch an alle die ich jetzt vergessen habe – danke für die schöne Zeit, die Unterstützung, die Grillabende, die Weihnachtsmärkte, die „Filmseminare“ und all das! So ein Zusammenhalt hilft schon enorm weiter!

Und noch ein Wort an **Georg** und **Franzi**: Jetzt kommt der Endspurt, ihr seid die nächsten!

Dazu gab es natürlich noch einige Leute, die schon länger weg sind, die aber nicht unerwähnt bleiben sollen. Danke an **Beni** und **Benni** für all die Hilfe für den unfähigen neu-Doktoranden. Vielen Dank an **Stephie** und **Marc** für die meist beruhigen Worte und vielen Dank an **Martin** für all die Biere und Berge – wir schaffen den Großvenediger schon noch, spätestens wenn deine Kinder ausm haus sind!

Naben all den Kollegen gilt es aber auch noch weiteren Menschen zu danken, meiner Münchner Familie **Regina, Hermine, Max** und **Eva** – die von Anfang an dafür gesorgt haben, dass ich in München doch nicht ganz so neu und fremd war.

Und zu guter Letzt gebührt der größte Dank natürlich meinen **Eltern**! Ich weiß nicht ob man bessere Unterstützung bekommen kann als ich von euch – auch wenn das auch manchmal vor allem daraus bestand eben nicht zu fragen wie es grad läuft. Ohne euren Rat und eure Hilfe wäre ich jetzt wohl nicht hier!

So, das war es jetzt und ihr müsst auch alle nicht mehr Fragen wann ich denn endlich fertig bin – ich habe darauf ja eh schon lange nicht mehr geantwortet 😊